

Medizinische Klinik Innenstadt  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

**CpG-Oligonukleotide:  
Einfluss auf die Zytokinproduktion und die kostimulatorische  
Fähigkeit humaner B-Lymphozyten**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Philipp Moritz Wagner  
aus München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Endres

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Roscher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.J. Kolb

Prof. Dr. G. Enders

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. G. Hartmann

Dr. med. B. Jahrsdörfer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2007

Meinen Eltern in Dankbarkeit

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Die Biologie der B-Lymphozyten .....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Die Entwicklung der B-Lymphozyten .....	2
1.2.2. Die Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten .....	2
1.2.3. Die Präsentation von Antigenen durch B-Lymphozyten .....	3
1.2.4. Die Produktion von Zytokinen durch B-Lymphozyten .....	4
<b>1.3. CpG-Oligonukleotide als Aktivatoren des Immunsystems.....</b>	<b>5</b>
1.3.1. Die Entdeckung der immunstimulatorischen Wirkung von CpG-Oligonukleotiden .....	5
1.3.2. <i>Pattern-recognition</i> als Erkennungsmechanismus für CpG-Oligonukleotide .....	6
1.3.3. Die Erkennung von CpG-Oligonukleotiden durch das angeborene Immunsystem .....	7
1.3.4. Die Existenz dreier verschiedener Klassen von CpG-Oligonukleotiden ..	9
1.3.5. Die unterschiedliche Wirkung der CpG-Oligonukleotide auf zellulärer Ebene im Immunsystem des Menschen und der Maus .....	9
1.3.6. Die Wirkungsweise der CpG-Oligonukleotide auf subzellulärer Ebene ..	10
1.3.7. Die Wirkungsweise von CpG-Oligonukleotiden auf zellulärer Ebene ....	11
1.3.7.1. Dendritische Zellen .....	11
1.3.7.2. B-Lymphozyten .....	11
1.3.7.3. T-Lymphozyten .....	12

---

<b>2. Material und Methoden</b> .....	13
<b>2.1. Geräte, Chemikalien und Reagenzien</b> .....	13
2.1.1. Geräte .....	13
2.1.2. Chemikalien .....	13
2.1.3. Radioaktive Chemikalien .....	13
2.1.4. Reagenziensätze .....	14
2.1.5. Materialien für die Zellkultur .....	14
2.1.6. Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzen .....	15
2.1.7. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen .....	15
2.1.8. Antikörper.....	16
2.1.9. Oligonukleotide .....	16
2.1.10. Primer für die <i>real-time</i> -PCR.....	17
<b>2.2. Zellulär-immunologische Methoden</b> .....	17
2.2.1. Zellkulturen .....	17
2.2.2. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	17
2.2.3. Bestrahlung von Stimulatorzellen .....	17
2.2.4. Kultivierung der CD40 Ligand-transfizierten Fibroblasten und der Kontrollzelllinie .....	18
2.2.5. Kultivierung von isolierten B-Lymphozyten und T-Lymphozyten .....	18
2.2.6. Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes .....	19
2.2.7. Aufreinigung der Zellen mittels magnetischer Zellsortierung .....	19
2.2.8. Aufreinigung der Zellen mit der FACS-Technologie .....	20
2.2.9. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	20
2.2.10. Durchflusszytometrie .....	21
2.2.11. Allogene gemischte Lymphozytenkultur (allogene MLR) .....	22
2.2.12. Bestimmung der Proliferation von T-Lymphozyten .....	23
2.2.12.1. Durchflusszytometrie.....	23
2.2.12.2. [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Assay.....	23
<b>2.3. Molekularbiologische Methoden</b> .....	24
2.3.1. Extraktion zytoplasmatischer DNA.....	24
2.3.2. Reverse Transkription der RNA in <i>copy</i> -DNA.....	24
2.3.3. <i>Real-time</i> -Polymerase-Kettenreaktion ( <i>real-time</i> -PCR).....	25
<b>2.4. Statistische Analyse</b> .....	26

---

<b>3. Ergebnisse</b>	27
<b>3.1. Expression von TLR4 und TLR9 in naiven B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen</b>	27
<b>3.2. Erkennung von CpG-Oligonukleotiden und mikrobiellem Lipopolysaccharid durch B-Lymphozyten</b>	28
<b>3.3. Die Regulation der Zytokinsynthese durch CpG-Oligonukleotide und CD40 Ligand in B-Lymphozyten</b>	29
3.3.1. Die Regulation der Synthese von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- $\alpha$	29
3.3.2. Die Regulation der Synthese von Interleukin-12	31
3.3.2.1. Die Induktion von Interleukin-12p70 erfordert sowohl CpG-ODN als auch CD40L	31
3.3.2.2. Interleukin-4 inhibiert die Bildung von Interleukin-12p70 in B-Lymphozyten	34
3.3.2.3. Die Quervernetzung des Antigenrezeptors spielt keine Rolle in der Regulation der Synthese von Interleukin-12	35
3.3.2.4. LPS hat keinen Einfluss auf die Synthese von Interleukin-12 in B-Lymphozyten	36
3.3.2.5. Mikrobielle DNA führt wie CpG-ODN in Gegenwart von CD40L zur Produktion von Interleukin-12p70 in B-Lymphozyten	38
<b>3.4. Einfluss von CpG-aktivierten B-Lymphozyten auf die Immunantwort der T-Lymphozyten</b>	40
3.4.1. Expression von kostimulatorischen Molekülen auf B-Lymphozyten	40
3.4.2. Aktivierte B-Lymphozyten induzieren Proliferation in allo-genen T-Lymphozyten	41
3.4.3. Aktivierte B-Lymphozyten induzieren in naiven allo-genen T-Lymphozyten eine starke Proliferation	43
3.4.4. Gleichzeitig mit CD40L und CpG-ODN stimulierte B-Lymphozyten verstärken die Produktion von Interferon- $\gamma$ in T-Lymphozyten	46
<b>3.5. Regulation der Plasmazelldifferenzierung durch CpG-Oligonukleotide und CD40 Ligand</b>	47

---

<b>4. Diskussion</b>	50
<b>4.1. Übersicht über die experimentellen Befunde</b>	50
<b>4.2. Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur</b>	52
4.2.1. TLR-Expression in B-Lymphozyten	52
4.2.2. CpG-Oligonukleotide induzieren eine starke Zytokinproduktion in B-Lymphozyten	54
4.2.3. B-Lymphozyten benötigen für die Produktion von Interleukin-12p70 die Anwesenheit von CpG-Oligonukleotiden und CD40 Ligand	56
4.2.4. Steuerung der Zytokinproduktion in B-Lymphozyten	56
4.2.4.1. Regulation durch T-Lymphozyten	57
4.2.4.2. Regulation durch Liganden der Toll-like-Rezeptoren	59
4.2.4.3. Regulation durch dendritischen Zellen und Makrophagen	59
4.2.5. Der Einfluss der CpG-Oligonukleotiden auf die kostimulatorische Fähigkeit der B-Lymphozyten	60
4.2.6. Die immunregulatorische Funktion der B-Lymphozyten	61
4.2.6.1. Unterdrückung einer T <sub>H</sub> 1-Immunantwort durch B-Lymphozyten	61
4.2.6.2. Verstärkung einer T <sub>H</sub> 1-Immunantwort durch B-Lymphozyten	62
4.2.6.3. Welchen Effekt haben B-Lymphozyten nach Kontakt mit CpG-ODN auf die Immunantwort der T-Lymphozyten?	63
4.2.7. Die Regulation der Antikörperproduktion durch CpG-Oligonukleotide	64
4.2.7.1 Verstärkung der Antikörperbildung durch CpG-ODN	65
4.2.7.2. Wirkung von Zytokinen auf die Produktion von Autoantikörpern	66
<b>4.3. Der therapeutische Einsatz von CpG-Oligonukleotiden</b>	67
4.3.1. CpG-Oligonukleotide als Vakzine-Adjuvans	67
4.3.2. CpG-Oligonukleotide in der Immuntherapie von Tumoren	68
4.3.3. CpG-Oligonukleotide in der Immuntherapie allergischer Erkrankungen	68
<b>5. Zusammenfassung</b>	70
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	73
<b>7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme</b>	84
<b>8. Danksagung</b>	86
<b>9. Veröffentlichungen</b>	87
<b>10. Lebenslauf</b>	89

# 1. Einleitung

## 1.1. Fragestellung

Im Rahmen der Therapie von malignen Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten und Infektionen stellt die Immuntherapie eine mögliche neue Behandlungsmethode dar. Unter Immuntherapie versteht man die gezielte Beeinflussung der Immunreaktion des Organismus. Zur Immunstimulation wurden in den letzten Jahren verschiedenste natürliche und synthetische Stoffe verwendet. Wichtige Vertreter dieser immunstimulierenden Stoffe sind Oligodesoxynukleotide (ODN, kurz Oligonukleotide), welche Cytidin-(phosphat)-Guanosin-Dinukleotide (CpG) enthalten. Diese so genannten CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) werden über *Toll-like-Rezeptor 9* (TLR9) erkannt und führen zu einer Aktivierung des Immunsystems.

CpG-Oligonukleotide stimulieren im humanen Immunsystem direkt B-Lymphozyten und plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs). Nur diese beiden Zelltypen verfügen über den Rezeptor TLR9, welcher zur Erkennung der CpG-Oligonukleotide nötig ist. Bei deren Aktivierung kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen und zu einer vermehrten Expression von Oberflächenmolekülen. Hierdurch werden andere Immunzellen wie T-Lymphozyten, Makrophagen oder Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) stimuliert. Insgesamt führt die systemische Applikation von CpG-Oligonukleotiden zu einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort, die durch die Entwicklung Interferon- $\gamma$ -produzierender T-Lymphozyten charakterisiert ist. Diese Form der Immunantwort ist im Besonderen dazu geeignet intrazelluläre Erreger zu bekämpfen. Die PDCs spielen bei der Induktion einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort eine entscheidende Rolle, da sie in Anwesenheit von CpG-Oligonukleotiden Interferon- $\alpha$  sezernieren, welches die Differenzierung von naiven T-Lymphozyten zu Interferon- $\gamma$ -produzierenden T-Lymphozyten fördern. Ob auch B-Lymphozyten einen relevanten Einfluss auf die Etablierung einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort haben, ist bisher noch nicht hinreichend erforscht.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher geklärt werden, welche Art von Zytokinen nach Aktivierung mit CpG-Oligonukleotiden von B-Lymphozyten produziert werden und ob B-Lymphozyten über diese Zytokine die Bildung von Interferon- $\gamma$ -produzierenden T-Lymphozyten induzieren können. Ergänzend dazu wurde die Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf die Plasmazelldifferenzierung der B-Lymphozyten und deren Antikörpersekretion untersucht. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit dem CpG-Oligonukleotid ODN 2006 gearbeitet, welches einen starken Stimulus für humane B-Lymphozyten darstellt.



## 1.2. Die Biologie der B-Lymphozyten

### 1.2.1. Die Entwicklung der B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten entwickeln sich im Knochenmark und werden ein ganzes Leben hindurch produziert. Die einzelnen Stadien der Entwicklung der B-Lymphozyten sind durch eine irreversible Umordnung in den Immunglobulingenen gekennzeichnet. Das Ergebnis dieses Prozesses ist ein unreifer B-Lymphozyt, der Immunglobuline vom Isotyp IgM bildet. Diese Immunglobuline werden auf der Zelloberfläche exprimiert und dienen als Antigenrezeptor. Unreife B-Lymphozyten, die im Knochenmark Antigene binden, sterben ab, werden anergisch oder ändern ihren Rezeptor. Dieser Vorgang der ligandenabhängigen Selektion ist von entscheidender Bedeutung für die Erhaltung der Selbst-Toleranz [Goodnow, 1995]. Sobald die B-Lymphozyten ausgereift sind verlassen sie das Knochenmark und wandern zu den lymphatischen Organen [Rajewsky, 1996]. Die Vielfalt der B-Lymphozyten, die in den Pool der reifen B-Lymphozyten eingehen, stellt das Ausgangsmaterial für die klonale Selektion der adaptiven Immunantwort dar.

### 1.2.2. Die Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten

Die reifen naiven B-Lymphozyten zirkulieren durch die lymphatischen Organe bis sie ihrem spezifischen Antigen begegnen. Die Aktivierung der B-Lymphozyten ist zunächst von der Bindung des Antigens durch den Antigenrezeptor abhängig. Dieser sendet nach der Bindung des Antigens über die Aktivierung von Tyrosinkinasen Signale ins Zellinnere, die über mehrere Reaktionswege zur Aktivierung der B-Lymphozyten führen [Pleiman, 1994]. Zudem schleust der Antigenrezeptor das Antigen in das endosomale System der B-Lymphozyten ein. Hier wird das Antigen durch Proteasen abgebaut und kehrt als an *Major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-II-Moleküle gebundene Peptide zur Zelloberfläche zurück. Antigen-spezifische CD4-positive T-Lymphozyten (CD, *cluster of differentiation*) können dann den Komplex von Peptid und MHC-Klasse-II-Molekül erkennen [Lanzavecchia, 1990]. Diese Interaktion der B-Lymphozyten mit den spezifischen CD4-positiven T-Lymphozyten (T-Helferzellen) ist der entscheidende Schritt für die weitere Entwicklung der B-Lymphozyten in Richtung Plasmazelle. Das Zusammentreffen beider Zellen findet in der T-Zell-Region der lymphatischen Organe statt.

Die Interaktion zwischen B-Lymphozyten und T-Helferzellen wird sowohl durch Oberflächenmoleküle als auch durch Zytokine vermittelt. Ein besonders wichtiges

Oberflächenmolekül der T-Helferzellen ist ein membranständiges Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)-Familie, welches als CD40 Ligand (CD40L oder CD154) bezeichnet wird. CD40L bindet an das CD40-Oberflächenmolekül, welches auf der Zelloberfläche der B-Lymphozyten exprimiert wird [Banchereau, 1994]. CD40 gehört zur TNF-Rezeptorfamilie und ist an der Steuerung aller Phasen der Aktivierung des B-Lymphozyten beteiligt. Die Bindung von CD40L an CD40 lässt den ruhenden B-Lymphozyten in den Zellzyklus eintreten und ist daher für die Reaktion der B-Lymphozyten gegen die meisten Antigene unerlässlich. Patienten mit CD40L-Mutationen zeigen nur sehr schwache und ineffektive Antikörperantworten. Sie leiden unter einer schweren humoralen Immunschwäche, die als X-gekoppeltes Hyper-IgM-Syndrom bezeichnet wird [Aruffo, 1993].

Während der Entwicklung der B-Lymphozyten zur Plasmazelle spielt neben der Interaktion von Oberflächenmolekülen die Aktivierung durch Zytokine eine entscheidende Rolle. Erkennen T-Helferzellen auf der Oberfläche eines B-Lymphozyten den passenden Peptid:MHC-Klasse-II-Komplex, so sezernieren sie Zytokine. Diese Zytokine führen in Verbindung mit der Stimulation durch CD40L zur klonalen Vermehrung des B-Lymphozyten, die der Differenzierung zur Plasmazelle vorangeht. Hierbei sind unter anderem Zytokine wie Interleukin-3, Interleukin-6 und Interleukin-10 wichtig für die Plasmazellentwicklung [Liu, 1997]. Über Zytokine wie Interleukin-4, Interleukin-5, Interferon- $\gamma$  wird in weiteren Differenzierungsschritten festgelegt, welcher Immunglobulin-Isotyp von den Plasmazellen sezerniert wird [Stavnezer, 1996]. Endpunkt der durch die B-Lymphozyten vermittelten adaptiven Immunantwort ist die Bildung von Plasmazellen, die aus den lymphatischen Organen in das Knochenmark auswandern und dort große Mengen an Immunglobulinen sezernieren. Einige B-Lymphozyten vollziehen jedoch nicht die Differenzierung zur Plasmazelle, sondern verbleiben als langlebige B-Gedächtniszellen in den lymphatischen Organen. Diese B-Gedächtniszellen sind im Falle eines erneuten Kontaktes mit dem Antigen Ausgangspunkt einer schnellen und sehr effizienten humoralen Immunantwort.

### 1.2.3. Die Präsentation von Antigenen durch B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten sind durch ihre Antigenrezeptoren auf eine einzigartige Weise dazu geeignet lösliche Moleküle zu binden. Sie nehmen die löslichen Antigene, die vom Antigenrezeptor gebunden werden, in das Zellinnere auf und präsentieren anschließend Peptidfragmente dieses Antigens als Peptid:MHC-Klasse-II-Komplexe. T-Helferzellen können ihre spezifischen B-Lymphozyten erkennen und die

Differenzierung dieser B-Lymphozyten vorantreiben. Die Interaktion der B-Lymphozyten und deren T-Helferzellen zielt aber nicht nur auf die Stimulation der B-Lymphozyten ab, sondern vielmehr auf die Aktivierung beider Zelltypen. B-Lymphozyten sind in der Lage Oberflächenmoleküle zu exprimieren, die T-Helferzellen so genannte kostimulierende Signale übermitteln. Die am besten charakterisierten kostimulierenden Moleküle auf B-Lymphozyten sind die strukturverwandten Glykoproteine CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) [Henry, 1999]. Sie sind homodimere Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie. Man findet sie ausschließlich auf der Oberfläche von Zellen, die das Wachstum von T-Lymphozyten anregen können. Dazu gehören neben den B-Lymphozyten die dendritischen Zellen und die Makrophagen. Der Rezeptor für CD80 und CD86 auf den T-Lymphozyten ist das Molekül CD28, welches ebenfalls ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie ist. Eine Bindung von CD80 oder CD86 an CD28 stimuliert die Proliferation von T-Lymphozyten, wenn diese über ihren T-Zellrezeptor an den für sie spezifischen Peptid:MHC-Klasse-II-Komplex binden. CD80 und CD86 werden konstitutiv auf dendritischen Zellen exprimiert. Im Gegensatz dazu präsentieren B-Lymphozyten diese Moleküle erst nach Aktivierung auf ihrer Oberfläche [Azuma, 1993; Hathcock, 1993].

#### 1.2.4. Die Produktion von Zytokinen durch B-Lymphozyten

B-Lymphozyten sind zur Synthese einer Vielzahl von Zytokinen wie Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6, Interleukin-10, Interleukin-12, Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  fähig [Harris, 2000; Pistoia, 1997]. Aufgrund ihrer Zytokinproduktion haben B-Lymphozyten eine wichtige regulierende Funktion bei der Differenzierung verschiedener Immunzellen. Der Einfluss von B-Lymphozyten auf die Differenzierung von T-Lymphozyten wurde bisher vor allem von der Arbeitsgruppe um Harris untersucht. Harris et al. konnten erstmals zeigen, dass sich murine B-Lymphozyten anhand ihres Zytokinprofils in zwei verschiedene Gruppen zusammenfassen lassen [Harris, 2000]. Die als *effector B cells 1* (Be1) bezeichneten B-Lymphozyten (Be1-Lymphozyten) produzierten hauptsächlich  $T_H1$ -Zytokine wie Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Interleukin-12 und förderten eine  $T_H1$ -Differenzierung von naiven T-Lymphozyten. Dagegen bilden die als Be2-Zellen bezeichneten B-Lymphozyten (Be2-Lymphozyten) Interleukin-4 und Interleukin-10 und induzierten eine  $T_H2$ -Differenzierung von naiven T-Lymphozyten.

Welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, dass B-Lymphozyten sich im Rahmen von Immunreaktionen als Be1-Zellen oder als Be2-Zellen differenzieren, ist bisher noch nicht geklärt. Wahrscheinlich beruht die Entscheidung, welche Zytokine

B-Lymphozyten produzieren, auf einer Vielzahl von Faktoren. Es ist zu vermuten, dass die Art des Antigens und die Differenzierung der T-Helferzellen, mit denen die B-Lymphozyten interagieren, eine wesentliche Rolle spielen. Ob auch CpG-Oligonukleotide das Zytokinprofil der B-Lymphozyten verändern, wird in dieser Arbeit untersucht.

## 1.3. CpG-Oligonukleotide als Aktivatoren des Immunsystems

### 1.3.1. Die Entdeckung der immunstimulatorischen Wirkung von CpG-Oligonukleotiden

Der New Yorker Chirurg William Coley beobachtete Ende des 19. Jahrhunderts, dass sich Weichteilsarkome nach einer Infektion mit *Streptococcus pyogenens* im Bereich des Tumors zurückbildeten. Darauf hin versuchte er Patienten mit inoperablen Sarkomen durch Injektion von Streptokokken-Lysaten in den Tumor zu behandeln. Erstaunlicherweise führte dies bei 45 Prozent seiner Patienten zur Rückbildung der Sarkome [Coley, 1991]. Sein Verfahren stellte die erste Form der Immuntherapie von Tumoren dar. Dieser Therapieansatz konnte sich jedoch nicht durchsetzen, da Behandlungsverfahren wie die Strahlentherapie und die Chemotherapie wesentlich bessere und reproduzierbarere Behandlungserfolge zeigten.

Bakterielle Lysate, wie Coley sie verwendet hatte, werden heute lediglich bei der Behandlung des Harnblasen-Karzinoms eingesetzt. Hierbei wird ein schwach virulenter Stamm von *Mycobacterium bovis* (sogenannter "*Bacille Calmette-Guérin*", BCG) lokal in den Tumor appliziert. Dieses Verfahren hat sich seit der Einführung 1976 durch Morales als Standardtherapie früher Tumorstadien des Harnblasenkarzinoms etabliert. Der genaue Wirkmechanismus dieses Therapieansatzes war jedoch zunächst unbekannt [Morales, 2002].

Untersuchungen von Tokunaga et al. konnten nachweisen, dass das reduzierte Wachstum von Tumoren nach Verwendung von BCG durch die Stimulation des Immunsystems erreicht wurde [Tokunaga, 1984]. Eine Auftrennung des BCG-Lysats in seine subzellulären Fraktionen zeigte, dass die höchste antitumorale Aktivität der DNA-Fraktion (DNA = Desoxyribonukleinsäure) zukam. Wenig später wurde entdeckt, dass bakterielle DNA bei Mäusen antitumoral und immunmodulatorisch wirkt [Yamamoto, 1992]. Diese Wirkung bakterieller DNA konnte bestimmten Nukleotidsequenzen mit einem zentralen Cytidin-(phosphat)-Guanosin-Dinukleotid

zugeordnet und mittels synthetischer Oligonukleotide imitiert werden [Yamamoto, 1994].

Die Arbeitsgruppe um Arthur Krieg machte schließlich 1995 die Beobachtung, dass bestimmte Oligonukleotide, die als Negativ-Kontrollen in Antisense-Experimenten eingesetzt wurden, B-Lymphozyten zur Proliferation anregten [Krieg, 1995]. Dieser Effekt konnte auf ein Sechs-Basen-Motiv mit zentralen CG-Dinukleotid zurückgeführt werden (5'...GACGTC... 3'). Für das Basensextett wurde die Bezeichnung "CpG-Motiv" eingeführt, wobei "p" für die Phosphatbindung zwischen Cytosin und Guanosin steht. Synthetische Oligonukleotide mit CpG-Motiven heißen demnach CpG-Oligonukleotide. Unverzichtbarer Bestandteil eines stimulierenden Oligonukleotides war das zentrale CG-Dinukleotid. Sowohl eine Inversion dieses CG-Dinukleotides zu GC als auch eine Methylierung am Cytosin hoben den immunstimulatorischen Effekt auf.

Die Frequenz von CG-Dinukleotiden in vertebraten DNA beträgt nur ca. ein Viertel der statistisch zu erwartenden Häufigkeit von 1 zu 16 und zudem sind diese CG-Dinukleotide in 80 Prozent der Fälle am Cytosin methyliert [Karlin, 1994]. Entsprechend konnten durch eine experimentell herbeigeführte Cytosin-Methylierung die Effekte bakterieller DNA oder synthetischer Oligonukleotide auf das Immunsystem blockiert werden [Stacey, 1996]. Mit den letztgenannten Entdeckungen war eine Erklärung gefunden, warum das Immunsystem von Säugetieren zwischen eigener und bakterieller DNA unterscheiden kann und vertebraten DNA im Gegensatz zu bakterieller DNA und synthetischen CpG-Oligonukleotiden keine immunmodulatorischen Effekte aufweist. Im Rahmen der Evolution hat das Immunsystem von Säugetieren gelernt, unmethylierte CpG-Motive als Gefahrensignal zu benutzen, an denen das Eindringen potenziell pathogener Mikroorganismen identifiziert werden kann.

### 1.3.2. *Pattern-recognition* als Erkennungsmechanismus für CpG-Oligonukleotide

Die Immunologie unterscheidet schematisch zwischen dem angeborenen und dem erworbenen (adaptiven) Immunsystem. Das angeborene Immunsystem reagiert schnell auf eindringende Mikroorganismen, hat aber ein sehr unspezifisches Reaktionsmuster, an dem Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und das Komplementsystem beteiligt sind. Dagegen zeigt das adaptive Immunsystem eine hochspezifische Reaktion gegen individuelle Erregerstämme, die sich teilweise nur minimal in ihren

Antigenen unterscheiden. Diese Reaktion tritt jedoch erst verzögert ein und ist von B-Lymphozyten und T-Lymphozyten getragen.

Das angeborene Immunsystem erkennt das Eindringen von Mikroorganismen anhand von universellen Mustern, die vielen mikrobiellen Erregern gemeinsam sind. Dieses Phänomen wird als *pattern recognition* bezeichnet [Medzhitov, 2001]. Mikrobielle DNA mit CpG-Motiven (CpG-DNA) stellt ein solches universelles Muster dar. Diese Muster haben folgende funktionelle Gemeinsamkeiten:

- Sie sind spezifisch für Mikroorganismen und kommen im Organismus von Säugetieren nicht vor.
- Man findet sie bei einer Großzahl pathogener Mikroorganismen, so dass wenige genetisch konservierte Rezeptoren ein Maximum an pathogenen Mikroorganismen erkennen können.
- Sie erfüllen eine überlebenswichtige Funktion für die Mikroorganismen, weshalb die Ausbildung von Escape-Mutanten selten ist.

Auf dem Mechanismus des *pattern recognition* basiert auch die Erkennung der synthetisch hergestellten CpG-Oligonukleotide, welche die oben genannten CpG-Motive als universelles Muster enthalten.

### 1.3.3. Die Erkennung von CpG-Oligonukleotiden durch das angeborene Immunsystem

Die Anwesenheit von CpG-DNA dient dem angeborenen Immunsystem als Warnsignal für das Eindringen von Mikroorganismen. Die Anwesenheit von Mikroorganismen kann durch den Einsatz von CpG-Oligonukleotiden imitiert werden. Das zugrunde liegende Prinzip ist hierbei die sogenannte *pattern recognition*, welche sich der *pattern recognition receptors* (PRR) zur Identifikation der Pathogene bedient. Die von den pathogenen Mikroorganismen stammenden Liganden werden als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) bezeichnet. Die Rezeptoren wurden auf Grund ihrer Ähnlichkeit mit dem *Toll*-Rezeptor der Fruchtfliege als *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs) bezeichnet. Diese Familie transmembranärer Rezeptoren umfasst bisher zehn Mitglieder. Bis jetzt wurden für fast alle TLRs Agonisten identifiziert, welche zumeist mikrobiellen Ursprungs sind. Allerdings werden auch Bestandteile des eigenen Organismus wie Hyaluronan oder Fibronektin erkannt [Okamura, 2001; Termeer, 2002]. Durch den Prozess der Rezeptorheterodimerisierung wird das Repertoire an Strukturen, welche durch TLRs erkannt werden, zusätzlich erhöht. So können manche

TLRs untereinander in Wechselwirkung treten und somit zusätzliche PAMPs detektieren [Ozinsky, 2000]. Die Tabelle 1 gibt einen kurzen Überblick über den bisherigen Wissenstand bezüglich der Liganden für die einzelnen TLRs.

<i>TLR</i>	<i>Ligand (= PAMP)</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Ref.</i>
TLR1	Kooperiert mit TLR2		[Hajjar, 2001]
TLR2	Lipoproteine	Gram-positive Bakterien	[Takeuchi, 1999]
	Zyomosan	Hefen	[Hajjar, 2001]
	<i>Macrophage-activating lipopeptide 2</i> (MALP-2)	Mykoplasmen	[Takeuchi, 2000]
	Lipoarabinomannan (LAM)	Mykobakterien	[Underhill, 1999]
TLR3	Lange doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA)	Viren	[Alexopoulou, 2001]
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien	[Hoshino, 1999; Poltorak, 1998]
	Protein F	RSV	[Kurt-Jones, 2000]
	Hsp 60	Wirt	[Ohashi, 2000]
	Hyaluronan	Wirt	[Termeer, 2002]
	Fibronektin	Wirt	[Okamura, 2001]
TLR5	Flagellin		[Hayashi, 2001]
TLR6	Kooperiert mit TLR2		
TLR7	Guanosin-Analoga	Nicht bekannt	[Hemmi, 2002]
	<i>Short interfering RNA</i>	Wirt	[Hornung, 2005]
TLR8	Guanosin-Analoga	Nicht bekannt	[Jurk, 2002]
TLR9	CpG-Motive	Bakterien, Viren	[Hemmi, 2000]
TLR10	Nicht bekannt	Nicht bekannt	

**Tabelle 1: Humane *Toll-like*-Rezeptoren und ihre Liganden**

CpG-Oligonukleotide werden vom angeborenen Immunsystem über TLR9 erkannt. Erste Hinweise hierauf ergaben sich durch die Analyse der Signaltransduktionskaskade, die durch die Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden in murinen Makrophagen induziert wird [Sparwasser, 1997]. Die durch CpG-Oligonukleotide ausgelöste Genexpression zeigte eine deutliche Analogie zur Gen-Expression nach Aktivierung mit dem bereits bekannten TLR4-Liganden, dem bakteriellen Lipopolysaccharid (LPS). Hemmi et al. identifizierten letztendlich anhand von TLR-*Knock-out*-Mäusen die Expression von TLR9 als notwendige Voraussetzung für die Erkennung von CpG-DNA [Hemmi, 2000]. Diese Beobachtung konnte für das humane Immunsystem bestätigt werden. Ferner wurde gezeigt, dass die Expression von TLR9 nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend ist, um CpG-Motive zu erkennen [Bauer, 1999].

### 1.3.4. Die Existenz dreier verschiedener Klassen von CpG-Oligonukleotiden

Alle CpG-Oligonukleotide werden durch TLR9 erkannt, unterscheiden sich aber deutlich in ihrem biologischen Wirkungsprofil. Auf Grund dieser Beobachtung wurde die Existenz von mindestens drei verschiedenen Klassen von CpG-Oligonukleotiden postuliert, die CpG-ODN Typ A, Typ B und Typ C genannt werden [Hartmann, 2003; Krieg, 2002]. CpG-ODN Typ A induziert große Mengen an Interferon- $\alpha$  in PDCs [Krug, 2001], wird aber von B-Lymphozyten nicht erkannt. CpG-ODN Typ B stellt einen starken Stimulus für B-Lymphozyten dar [Hartmann, 2000; Krieg, 1995], jedoch werden lediglich geringe Mengen an Interferon- $\alpha$  in PDCs induziert [Krug, 2001]. CpG-ODN Typ C vereinigt die beiden Eigenschaften von Typ A und Typ B und führt sowohl zur Produktion von Interferon- $\alpha$  in PDCs als auch zur starken Aktivierung der B-Lymphozyten [Hartmann, 2003]. Die Einteilung in diese Klassen erfolgt primär aufgrund der unterschiedlichen biologischen Wirkprofilen und nicht anhand von spezifischen strukturellen Eigenschaften. Letztendlich ist noch nicht geklärt, aufgrund welcher Mechanismen die verschiedenen Klassen der CpG-Oligonukleotide so unterschiedliche Effekte auf B-Lymphozyten und PDCs haben. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit einem CpG-Oligonukleotid vom Typ B (ODN 2006) gearbeitet.

### 1.3.5. Die unterschiedliche Wirkung der CpG-Oligonukleotide auf zellulärer Ebene im Immunsystem des Menschen und der Maus

CpG-Oligonukleotide aktivieren nur die Zellen des Immunsystems, die TLR9 exprimieren. Im humanen Immunsystem verfügen lediglich die B-Lymphozyten und die PDCs über TLR9 [Hornung, 2002]. Im Gegensatz dazu exprimieren im murinen Immunsystem neben B-Lymphozyten und PDCs auch Zellen der myeloiden Stammreihe TLR9. Zu ihnen werden Monozyten, Makrophagen und myeloide dendritische Zellen (MDCs) gezählt. Alle myeloiden Immunzellen können somit bei der Maus direkt durch CpG-Oligonukleotide aktiviert werden. Im humanen Immunsystem werden sie dagegen nur indirekt über Zytokine und kostimulatorische Moleküle stimuliert.

Viele Erkenntnisse über die Effekte von CpG-Oligonukleotiden wurden in Experimenten an Mäusen gewonnen. Die direkte Übertragung der Beobachtungen auf den Menschen ist allerdings immer zu hinterfragen, da im menschlichen Organismus wie oben



beschrieben die gesamte myeloide Stammreihe nicht durch CpG-Oligonukleotide direkt aktivierbar ist.

### 1.3.6. Die Wirkungsweise der CpG-Oligonukleotide auf subzellulärer Ebene

CpG-Oligonukleotide werden über TLR9 erkannt und führen zur Aktivierung des Immunsystems. Wie alle anderen TLRs besitzt TLR9 eine *Toll*-homologe Domäne im zytoplasmatischen Abschnitt [Rock, 1998]. Diese intrazytoplasmatische Region ist entscheidend für die Signaltransduktion bei der Bindung des spezifischen Liganden an den TLR. Die meisten heute bekannten TLRs einschließlich TLR9 nutzen den *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) als Adapterprotein. Über dieses Adapterprotein rekrutieren die TLRs die IL-1R-assoziierte Kinase (IRAK), die den TNFR-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) phosphoryliert. In Abhängigkeit von TRAF6 wird nun über weitere Schritte der *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) induziert. Dieser bewirkt eine inflammatorische Antwort, die unter anderem die Transkription von Genen für Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 und Interleukin-6 beinhaltet. Jeder TLR aktiviert letztendlich zwar nicht identische, aber großteils überlappende Gene. Im Wesentlichen sind dies Gene für inflammatorische Zytokine, Chemokine, antimikrobielle Peptide, MHC-Proteine, kostimulatorische Proteine und andere Mechanismen, die für eine effektive immunologische Sofortabwehr und Aktivierung des adaptiven Immunsystems erforderlich sind.

Im Gegensatz zu anderen TLRs ist TLR9 nicht in der Zellmembran lokalisiert sondern findet sich in der Membran von Endolysosomen [Ahmad-Nejad, 2002]. Daher müssen CpG-Oligonukleotide erst endozytotisch aufgenommen werden, um in reifen Endolysosomen an TLR9 zu binden und ihre Wirkung zu entfalten. Immobilisierte CpG-Oligonukleotide zeigen daher keinen Effekt [Manzel, 1999]. Zudem binden CpG-Oligonukleotide erst nach einer Azidifizierung im endosomalen Kompartiment an TLR9 [Hacker, 1998]. Chloroquin als Inhibitor der endosomalen Azidifizierung blockiert folglich ebenfalls den CpG-Effekt [Macfarlane, 1998].

### 1.3.7. Die Wirkungsweise von CpG-Oligonukleotiden auf zellulärer Ebene

#### 1.3.7.1. Dendritische Zellen

Für dendritische Zellen (DCs) stellen CpG-Oligonukleotide einen äußerst starken Stimulus dar, der die Zellen zur Ausreifung bringt. Die primären DCs des peripheren Blutes überleben in Anwesenheit von CpG-Oligonukleotiden *in vitro* ohne Zytokinzusatz und werden zu potenten Aktivatoren allogener T-Lymphozyten [Hartmann, 1999]. Im peripheren humanen Blut findet man zwei Subpopulationen von DCs, die CD11c-negativen PDCs und die CD11c-positiven MDCs. Lediglich die CD11c-negative Fraktion der DCs des peripheren Blutes verfügt über TLR9 und reagiert direkt auf CpG-Stimulation [Bauer, 2001; Kadowaki, 2001; Krug, 2001]. Da im humanen Immunsystem Zellen der myeloiden Stammreihe kein TLR9 exprimieren, werden die MDCs lediglich sekundär durch CpG-induzierte Zytokine aktiviert [Hartmann, 1999]. Die DC-Fraktion, die direkt auf CpG-Oligonukleotide reagiert, stellte sich als identisch mit den PDCs des peripheren Blutes heraus [Cella, 1999; Siegal, 1999]. Bei den PDCs handelt es sich um eine Subpopulation der DCs, die sich im Rahmen einer Virusinfektion durch die Produktion sehr großer Mengen von Interferon- $\alpha$  auszeichnet. Sie wurde schon in den siebziger Jahren beschrieben und als Interferon-produzierende Zelle (IPC) bezeichnet [Fitzgerald-Bocarsly, 1993]. Später zeigte sich, dass es sich bei der so genannten IPC um eine unreife Vorstufe der PDC handelt [Siegal, 1999].

Die Aktivierung dieser PDCs mit CpG-ODN Typ A und Typ C führt zur Ausreifung der Zellen und zur Induktion großer Mengen an Interferon- $\alpha$  [Hartmann, 2003; Krug, 2001]. Mit der Kombination von CpG-ODN Typ B und CD40L erreicht man je nach Ausreifungsgrad der PDCs die Produktion von Interleukin-12 oder Interferon- $\alpha$  [Krug, 2001].

#### 1.3.7.2. B-Lymphozyten

In Versuchen mit murinen Immunzellen [Krieg, 1995] und später mit humanen Zellen aus dem peripheren Blut [Hartmann, 2000] wurde gezeigt, dass B-Lymphozyten durch CpG-Oligonukleotide direkt aktiviert werden. Auf den B-Lymphozyten wird durch CpG-Stimulation die Expression von CD80, CD86 und MHC-Klasse-II-Molekülen gesteigert, wodurch die Zellen ihre Kompetenz als antigenpräsentierende Zellen erlangen [Hartmann, 2000]. Zudem wird CD40 vermehrt exprimiert, was eine verstärkte

Aktivierung durch CD40L im Rahmen einer Interaktion mit den T-Helferzellen erlaubt [Bauer, 1999]. B-Lymphozyten greifen zudem durch eine erhöhte Produktion von Zytokinen wie Interleukin-6, Interleukin-10, Interleukin-12 und TNF- $\alpha$  in die durch CpG-Stimulation ausgelöste Immunantwort ein [Bohle, 2001; Decker, 2000; Klinman, 1996; Redford, 1998; Shirota, 2002]. Außer dass CpG-Oligonukleotide die immunregulatorischen Eigenschaften der B-Lymphozyten verstärken, wird durch Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden die Differenzierung in Richtung Plasmazelle gefördert. Bei simultaner Aktivierung mit Antigen steigern CpG-Oligonukleotide die Produktion und Sekretion von Immunglobulinen [Krieg, 1995]. Dabei wird im Mausmodell ein Wechsel der Isotypen der Immunglobuline hin zu dem besonders effektiven Isotyp IgG2a beobachtet. Aufgrund der Hemmung der spontanen Apoptose durch CpG-Oligonukleotide werden B-Lymphozyten überlebensfähiger und stehen für längere Zeit zum Aufbau einer Immunantwort zur Verfügung [Yi, 1998].

#### 1.3.7.3. T-Lymphozyten

T-Lymphozyten werden nicht direkt über CpG-Oligonukleotide aktiviert, da sie kein TLR9 exprimieren [Hornung, 2002]. Allerdings hatten CpG-Oligonukleotiden einen entscheidenden Einfluss auf die durch T-Lymphozyten vermittelte Immunantwort. Mehrere Studien an Mäusen und Primaten konnten zeigen, dass die Gabe von CpG-Oligonukleotiden die Aktivierung antigenspezifischer T-Lymphozyten verstärkt und zu einer vermehrten Produktion von Interferon- $\gamma$  durch diese Zellen führt [Davila, 2000; Vabulas, 2000; Verthelyi, 2002]. Die verbesserte Immunantwort der T-Lymphozyten wurde in den meisten *in vitro*-Modellen durch eine verstärkte Aktivierung der PDCs erklärt [Kadowaki, 2001; Krug, 2001]. Vor allem CpG-ODN vom Typ B (ODN 2006), welches in PDCs hauptsächlich Interleukin-12 induziert, war besonders geeignet für die Aktivierung naiver T-Lymphozyten [Rothenfusser, 2004; Vabulas, 2000]. Allerdings konnte auch für murine B-Lymphozyten gezeigt werden, dass sie nach Stimulation mit CpG-ODN antigenspezifische T-Lymphozyten aktivieren können [Shirota, 2002]. Inwieweit humane B-Lymphozyten fähig sind, die Bildung Interferon- $\gamma$ -produzierender T-Lymphozyten in Gegenwart von CpG-ODN zu induzieren, ist eine der Fragestellungen, die in dieser Arbeit behandelt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte, Chemikalien und Reagenzien

#### 2.1.1. Geräte

Betaplate Liquid Scintillation Counter	Fa. Wallac Oy (Turku, FIN)
Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech (Guernsey, GB)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Gene Quant RNA/ DNA Calculator	Fa. Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Lamin Air (HB 244 8)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
MicroCell Harvester	Fa. Skatron (Transby, DK)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)
MiniMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Thermocycler Modell T3	Fa. Biometra (Göttingen, D)
Thermocycler RoboCycler Gradient 40	Fa. Stratagene (Heidelberg, D)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Syst. (Hamburg, D)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge	Fa. Heraeus (München, D)
Zentrifuge (5417R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)

#### 2.1.2. Chemikalien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung 0,02%	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Geneticin g-418 Sulfat	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Heparin-Natrium	Fa. Ratiopharm (Ulm, D)
Ortho-mune Lyse-Reagenz	Fa. Ortho-Clinical Diagnostics (Neckarsgmünd, D)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

#### 2.1.3. Radioaktive Chemikalien

[ <sup>3</sup> H]-Thymidin	Amersham Buchler (Freiburg, D)
----------------------------	--------------------------------

## 2.1.4. Reagenziensätze

### Zellisolation mittels der MACS-Methode

CD19+ B Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD4+ T Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD45RO Microbeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Pan T Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

### RNA Isolation, reverse Transkription und PCR

First-Strand-cDNA Synthesis Kit	Fa. Roche (Mannheim, D)
High Pure RNA Isolation Kit	Fa. Roche (Mannheim, D)
LightCycler FastStart DNA SYBR Green I	Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D)

### Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA

Human IFN- $\gamma$ ELISA	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick NJ, USA)
Human IL-12p40 + p70 ELISA	Fa. BenderMedSystems (Wien, A)
Human IL-4 ELISA Kit	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
Human IL-6 ELISA Kit	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
Human IL-10 ELISA Kit	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
Human IL-12p70 ELISA Kit	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
Human TNF- $\alpha$ ELISA Kit	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)

## 2.1.5. Materialien für die Zellkultur

Biocoll Separationsmedium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Fötales Kälberserum (FCS)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Humanes AB-Serum	Fa. BioWhittaker (Wakersville, MD, USA)
Humanes Serum-Albumin (HSA)	Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium	Fa. PAA (Linz, A)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhäusen, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB) und Corning (Corning NY, USA) bezogen.

### 2.1.6. Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzen

Dynabeads

( <i>anti-CD3/ anti-CD28-coated microbeads</i> )	Fa. Dynal (Hamburg, D)
<i>Escherichia coli</i> DNA	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>F(ab')<sub>2</sub> of rabbit anti-human Ig</i>	Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove PA, USA)
Interleukin-2	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interleukin-4	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interleukin-7	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interferon- $\gamma$	Strathmann Biotech (Hannover, D)
Lipopolysaccharid (LPS) (Herkunft: <i>Salmonella typhimurium</i> )	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

### 2.1.7. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Folgende Medien und Puffer wurden für die Zellkultur verwendet:

<u>RPME-Vollmedium:</u> RPME-Medium 10 Vol % FCS 100 IU/ ml Penicillin 100 µg/ ml Streptomycin 2 mM Glutamin	<u>DMEM-Selektionsmedium:</u> DMEM-Medium 5 Vol % FCS 100 IU/ ml Penicillin 100 µg/ ml Streptomycin 2 mM Glutamin 200 µg/ ml Geneticin g418 Sulfat
<u>MACS-Puffer:</u> PBS 0,5 Vol % HSA 2 mM EDTA pH 7,2	<u>TE-Puffer:</u> Deionisiertes Wasser 10 mM Tris Chlorid 1 mM EDTA pH 8,0
<u>Kryo-Medium:</u> 50 Vol % IMDM-Vollmedium bzw. DMEM-Selektionsmedium 40 Vol % HSA bzw. FCS 10 Vol % DMSO	<u>Erythrozyten Lysepuffer:</u> Ortho-mune Lysereagenz in PBS

### Lösungen für molekularbiologische Methoden:

<u>Lyse / Bindepuffer:</u> 4,5 M Guanidiniumchlorid 50 mM Tris HCl 30 Vol % Triton X 100 pH 6,6 in Wasser	<u>DNase Inkubationspuffer:</u> 1 M NaCl 20 mM Tris HCl 10 mM MnCl <sub>2</sub> pH 7,0 in Wasser
<u>Waschpuffer I:</u> 5 M Guanidiniumchlorid 20 mM Tris HCl 60 Vol % Ethanol pH 6,6 in Wasser	<u>Waschpuffer II:</u> 20 mM NaCl 2 mM Tris HCl 80 Vol % Ethanol pH 7,5 in Wasser
<u>Elutionspuffer:</u> Nuklease-freies steriles Wasser	<u>TBE-Puffer:</u> 89 mM Tris-Borat 2 mM EDTA pH 8,3 in Wasser

### 2.1.8. Antikörper

Name	Spezifität	Klon	Isotyp	Fluoreszenz	Herkunft
Anti-CD3	CD3	SK7	Maus IgG <sub>1</sub>	APC	BD/Pharmingen
Anti-CD4	CD4	SK3	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	BD/Pharmingen
Anti-CD45RA	CD45RA	HI100	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	BD/Pharmingen
Anti-CD19	CD19	SJ25C1	Maus IgG <sub>1</sub>	APC	BD/Pharmingen
Anti-CD20	CD20	L27	Maus IgG <sub>1</sub>	PerCP	BD/Pharmingen
Anti-CD27	CD27	M-T271	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	BD/Pharmingen
Anti-CD38	CD38	HIT2	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	BD/Pharmingen
Anti-CD80	CD80	L-307.4	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	BD/Pharmingen
Anti-CD86	CD86	2331	Maus IgG <sub>1</sub>	APC	BD/Pharmingen
Anti-CD154	CD154	TRAP1	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	BD/Pharmingen
Anti-IgD	IgD	IA6-2	Maus IgG <sub>2A</sub>	FITC	BD/Pharmingen
Anti-IL-12	p40+p70	C8.6	Maus IgG <sub>1</sub>	-	BD/Pharmingen
Anti-MHC-II	MHC-II	TÜ169	Maus IgG <sub>2A</sub>	FITC	BD/Pharmingen

### 2.1.9. Oligonukleotide

Phosphorothioat-modifizierte ODNs wurden freundlicherweise von Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, USA) zur Verfügung gestellt. Alle ODNs waren negativ für Endotoxin getestet (LAL-Assay, Fa. BioWhittaker (Wakersville MD, USA)) und wurden, falls nicht anders angemerkt, in einer Konzentration von 3 µg/ ml eingesetzt. Fett gedruckt sind die jeweiligen CpG-Dinukleotide:

Name	Länge	Sequenz	Bezeichnung im Text
ODN2006	24-mer	5'- <b>tcg tcg</b> ttt tgt <b>cgt</b> ttt gtc <b>ggt</b> -3'	CpG-ODN
Poly-C	20-mer	5'-ccccccccccccccccccc-3'	Non-CpG-ODN

### 2.1.10. Primer für die *real-time*-PCR

Die in der *real-time*-PCR eingesetzten Primer-Paare wurden freundlicherweise von der Fa. Search LC (Heidelberg, D) zur Verfügung gestellt. Folgende Primer wurden für den PCR-Nachweis der TLR-Expression verwendet:

	5'	3'
TLR4	3'-TTTCTGCAATGGATCAAGGACCA-5'	3'-GGACACCACAACAATCACCTTTC-5'
TLR9	3'-CTTCCTCTACAAATGCATCACT-5'	3'-GTGACAGATCCAAGGTGAAGT-5'

## 2.2. Zellulär-immunologische Methoden

### 2.2.1. Zellkulturen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 %igen CO<sub>2</sub>/ Luftgemisch. Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar Air Flow durchgeführt.

### 2.2.2. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau angefärbt. Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt.

### 2.2.3. Bestrahlung von Stimulatorzellen

Zur Verhinderung von Zellteilungen der Stimulatorzellen (CD40 Ligand-transfizierte Fibroblasten und aktivierte B-Lymphozyten) wurden die jeweiligen Zellen in 2 - 3 ml



Medium aufgenommen und mit 30 Gray in einer Röntgenbestrahlungsanlage (Institut für Immunologie, LMU München, D) bestrahlt.

#### 2.2.4. Kultivierung der CD40 Ligand-transfizierten Fibroblasten und der Kontrollzelllinie

PD Dr. H. Engelmann (Institut für Immunologie, LMU München, D) stellte uns freundlicherweise die CD40 Ligand-transfizierten Fibroblasten sowie untransformierte Fibroblasten der Kontrollzelllinie (beide aus Säuglingshamsternieren) zur Verfügung. Die Zellen wurden in 550 ml Kulturflaschen in DMEM-Selektionsmedium kultiviert, wobei diese am Boden der liegenden Kulturflasche adhärten. Alle zwei bis drei Tage wurden vier Fünftel des Mediums erneuert, um die Konzentration des selektierenden Antibiotikums (Geneticin g418 Sulfat) über der Hemmschwelle zu halten. Entsprechend ihrem Wachstum wurden die Zellen alle fünf bis sieben Tage im Verhältnis 1:2 verdünnt und neu ausgesät. Zum Abernten dieser Zellen wurde das Medium abpipettiert und der Zellrasen für fünf Minuten mit 0,02%iger EDTA-Lösung bedeckt. Dadurch wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden vor dem Einsatz in Versuchen gewaschen und in Vollmedium überführt.

#### 2.2.5. Kultivierung von isolierten B-Lymphozyten und T-Lymphozyten

Aufgereinigte B-Lymphozyten wurden in 96-Well Rundboden-Platten in RPMI-Vollmedium mit 10 % FCS in einer Konzentration von 200.000 Zellen/ 200 µl kultiviert. Sollten die B-Lymphozyten mit Hilfe der CD40 Ligand-transfizierten Fibroblasten stimuliert werden, so wurden in den 96-Well Rundboden-Platten 20.000 bestrahlte CD40 Ligand-transfizierte Fibroblasten (entsprechend einem Verhältnis von 10:1) zugegeben. Für die Messung der Sekretion von IgM wurden 1 Mio. aufgereinigte B-Lymphozyten in 24-Well Flachboden-Platten in 1 ml RPMI-Vollmedium kultiviert.

In den Versuchen, in denen aktivierte B-Lymphozyten allopathen T-Lymphozyten als kostimulierende Zellen dienen sollten, wurden jeweils 100.000 bestrahlte B-Lymphozyten im angegebenen Verhältnis mit allopathen T-Lymphozyten in 96-Well Rundboden-Platten in RPMI-Vollmedium kokultiviert. Die Wirkung von Überständen von aktivierten B-Lymphozyten auf T-Lymphozyten wurde untersucht, indem 100.000 T-Lymphozyten in 96-Well Rundboden-Platten in 100 µl RPMI-Vollmedium kultiviert

wurden und 100 µl Überstand von den Kulturüberständen der B-Lymphozyten zugegeben wurden.

### 2.2.6. Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Gesunden Spendern wurde 100 ml Blut abgenommen, wobei anschließend pro 10 ml Blut 100 µl Heparin zugegeben wurde. Das Blut stand bei Raumtemperatur maximal zwei Stunden bevor daraus die Fraktion der mononukleären Zellen präpariert wurde. Zur Gewinnung der mononukleären Zellen für die Isolation naiver T-Lymphozyten wurde 100 ml heparinisiertes Blut aus der Nabelschnur gesunder Neugeborener verwendet.

Das Blut wurde auf vier Röhrchen à 50 ml verteilt, die zuvor mit je 15 ml Ficoll-Hypaque gefüllt worden waren. Anschließend wurde auf 50 ml mit sterilem 0,9 % NaCl vorsichtig aufgefüllt, ohne dass sich dabei die drei Phasen vermischten. Nach Zentrifugation (1000 g, 20 °C, 15 min, Beschleunigung 1, Bremsung 1) fand man in jedem Blue Cap von oben nach unten die folgende Schichtung vor: Plasma, Ring aus mononukleären Zellen (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, PBMC), Ficoll, Erythrozyten. Der PBMC-Ring wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues Blue Cap gegeben, mit NaCl auf 50 ml aufgefüllt und wiederum zentrifugiert (520 g, 20 °C, 15 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Anschließend folgten zwei Waschschriffe, bei denen der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 10 ml NaCl resuspendiert und jeweils zwei Suspensionen zusammenpipettiert, erneut auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert wurden (400 g, 4 °C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Vor dem letzten Waschschriff wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Zuletzt wurde das Zellpellet in dem gewünschten Kulturmedium aufgenommen, die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer und Trypanblaufärbung gezählt und auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Es wurden nur solche mononukleäre Zellfraktionen weiterverwendet, von denen über 95 % der Zellen den Farbstoff Trypanblau dank intakter Zellmembranen ausschlossen.

### 2.2.7. Aufreinigung der Zellen mittels magnetischer Zellsortierung

Bei der *magnetic activated cell sorting* (MACS)-Isolationmethode werden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an paramagnetische Mikropartikel (Mikrobeads) mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Nachdem die Zellen für 15 min in

einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C mit den Microbeads markiert wurden, wurden sie gewaschen und anschließend in MACS-Puffer resuspendiert. Danach wurde die markierte Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Die Säule wurde in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten eingebracht, wodurch alle mit Microbeads beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten wurden. Die unmarkierten Zellen wurden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wurde. Anschließend wurde die markierte Zellpopulation außerhalb des Magnetfelds mit einem Stempel aus der Säule eluiert. Sowohl die markierte (positive Selektion) als auch die unmarkierte Zellfraktion (Depletion) konnte anschließend in Kultur genommen werden.

Zur Aufreinigung nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagentsätze der Firma Miltenyi Biotec nach dem entsprechenden Herstellerprotokoll verwendet.

### 2.2.8. Aufreinigung der Zellen mit der FACS-Technologie

Für Zellsortierungen wurden unter sterilen Bedingungen 1 - 100 x 10<sup>6</sup> B-Lymphozyten mit FACS-Antikörpern gegen CD27 und IgD markiert, in Medium gewaschen, in 1,5 - 2 ml Medium resuspendiert und zur Entfernung von Zellaggregaten durch eine Nylonmembran mit 100 µm Poren filtriert. Die Sortierung wurde mit einem FACStarplus an der *sorting facility* des GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München, D) mit freundlicher Unterstützung von Dr. Ellwart durchgeführt.

### 2.2.9. *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Zur Bestimmung verschiedener Zytokine im Überstand von Zellkulturen wurde ein ultrasensitiver *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt. Bei dieser Methode werden zellfreie Kulturüberstände abgenommen und bei Bedarf entsprechend mit Medium verdünnt. Neben einer Standardreihe mit bekannter Zytokinmenge werden nun alle Proben in Wells pipettiert, die mit einem Zytokin-spezifischen Antikörper beschichtet sind. Während der zweistündigen Inkubationszeit binden die vorhandenen Zytokine an die Antikörper. Nach drei Waschschritten wird ein zweiter biotinylierter Antikörper zugegeben, der das bereits gebundene Zytokin an einem anderen Epitop bindet. Nach 30 min folgt ein Waschschriff. Daraufhin wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an Biotin bindet. Durch

Verwendung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper, wird eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht. Nach Entfernung des Konjugates durch einen weiteren Waschschrift, gibt man die Substratlösung hinzu. Das gebundene Enzym wird nun zu Farbstoff umgesetzt. Die Farbintensität, die proportional zur Protein-Konzentration der Probe ist, wird dann mittels eines ELISA-Readers eingelesen. Durch die Standardreihe besteht die Möglichkeit die in der Probe enthaltene Konzentration zu errechnen.

Die Konzentrationsbestimmung der Immunglobuline erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Messung der Zytokine. Die Messung der Immunglobuline wurde dankenswerterweise von Frau Dr. Barbara Bohle (Institut für Pathophysiologie der Universität Wien, A) durchgeführt. Da keine Standardreihe mit bekannter Immunglobulinmenge gemessen wurde, konnten nur qualitative Aussagen über die Menge an Immunglobulinen in den Überständen der B-Lymphozyten gewonnen werden. Als Messergebnis wurde die Extinktion (O.D., optische Dichte) angegeben.

## 2.2.10. Durchflusszytometrie

Im Rahmen der Durchflusszytometrie mittels eines *Fluorescence-activated-cell-sorters* (FACS) werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein entsprechendes Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom hintereinander einzeln durch einen Laserstrahl geführt. Dies bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihres Phänotyps zu unterscheiden und zu quantifizieren.

Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht) gesammelt und photometrisch detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht wird wesentlich durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation wird anhand dieser Kriterien ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Der Laserstrahl regt das Fluorochrom der für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten

Oberflächenmoleküle. Zu diesen Fähigkeiten der FACS-Analyse kommt beim FACS-Sorter noch die Möglichkeit dazu, die so charakterisierten Zellen einzeln in Tropfen zu verpacken, diese mit einer elektrischen Ladung zu versehen und zwischen Kondensatorplatten abzulenken, so dass Zellen nach ihren Eigenschaften aufgetrennt und in verschiedene Auffanggefäße sortiert werden können.

Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überlappen. Diese Überlappung wird durch Kompensation korrigiert, indem von jedem registrierten Fluoreszenzsignal der Anteil abgezogen wird, der durch Überlappung entsteht. Hierzu werden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Eigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt ist, während die anderen Fluorochrome, gebunden an geeignete Isotypen-Antikörper, als Negativkontrolle dienen. Hierbei wird sichtbar wie stark ein bestimmtes Fluorochrom in die anderen Kanäle hineinstrahlt. Entsprechend der beobachteten Überlappung wird die Kompensation zwischen den Kanälen justiert. Ebenso kann mit Hilfe der Isotypen die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so eingestellt werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Antigenen bzw. Eigenschaften qualitativ und quantitativ unterscheiden und vergleichen lassen.

Für FACS-Analysen wurden  $5 \times 10^5$  -  $3 \times 10^6$  Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen im zurücklaufenden Tropfen resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen daraufhin 15 min bei 4 °C unter Lichtausschluss mit Fluorescein-Isocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP) oder Allophycocyanin (APC) gekoppelten Antikörpern inkubiert und anschließend mit PBS einmal gewaschen. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur gemessen und anschließend mit Hilfe der Cell Quest Software analysiert.

### 2.2.11. Allogene gemischte Lymphozytenkultur (allogene MLR)

Bei der allogenen gemischten Lymphozytenkultur (allogene *mixed lymphocyte reaction*, allogene MLR) wurden die B-Lymphozyten nach dreitägiger Stimulation geerntet und bestrahlt, um anschließend mit allogenen T-Lymphozyten kokultiviert zu werden. Jeweils 100.000 B-Lymphozyten wurden in dem angegebenen Mischungsverhältnis mit den allogenen T-Lymphozyten in 96-Well Rundboden-Platten in Triplikaten angesetzt.

## 2.2.12. Bestimmung der Proliferation von T-Lymphozyten

T-Lymphozyten wurden mit allogenen B-Lymphozyten in einer allogenen MLR stimuliert. Nach fünf bzw. sieben Tagen wurde die Proliferation der T-Lymphozyten unter Verwendung der Durchflusszytometrie und des [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Assays bestimmt.

### 2.2.12.1. Durchflusszytometrie

Die Analyse der Proliferation mittels der Durchflusszytometrie gestaltet sich insofern als schwierig, als es nicht möglich ist, von dem prozentualen Anteil einer Zellpopulation an der Gesamtheit der Zellen auf eine tatsächliche stattgehabte Proliferation zurückzuschließen. Ein erhöhter prozentualer Anteil einer Zellpopulation kann zwar einerseits einer tatsächliche Proliferation entsprechen, andererseits auch lediglich einen erhöhten Verlust von restlichen Zellen bedeuten und somit eine Proliferation vortäuschen. Eine Abhilfe schafft hier die Proliferationsmessung mittels des Farbstoffes 5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE). CFSE bindet spontan und irreversibel sowohl intrazelluläre als auch oberflächliche Moleküle. Bei jeder Zellteilung wird die gleiche Menge an Farbstoff an beide Tochterzellen weitergegeben, die somit halb so stark fluoreszieren wie die „elterliche“ Zelle. Mit einer geeigneten Oberflächengegenfärbung gegen CD3 lassen sich somit gezielt die T-Lymphozyten auf Proliferation untersuchen.

Um eine homogene CFSE Färbung der T-Lymphozyten zu erreichen, wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen: 10 Mio. T-Lymphozyten wurden in 400  $\mu\text{l}$  PBS mit einer 1  $\mu\text{M}$  CFSE-Konzentration gegeben. Anschließend wurde die Suspension durchmischt, in ein neues Gefäß überführt, um evtl. am Rand haftende ungefärbte Zellen auszuschließen, und dann für 10 min auf Eis inkubiert. Um die Färbe-Reaktion zu stoppen und das extrazelluläre CFSE zu blocken, wurde dann 2 ml RPMI-Vollmedium hinzugegeben und anschließend mit NaCl zweimal gewaschen.

### 2.2.12.2. [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Assay

Vor der Proliferationsmessung wurden die Zellen mit je 1  $\mu\text{Ci}$ / Well [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin beladen. Nach 16 Stunden wurden die radioaktiv markierten Zellen mittels eines 96 MicroCell Harvesters auf Filtermatten gefällt und getrocknet. Die Radioaktivität des inkorporierten [ $^3\text{H}$ ]-Thymidins wurde nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit mit

einem Betaplate Liquid Scintillation Counter quantifiziert und als *counts per minute* (cpm) dargestellt. Anschließend wurde der Mittelwert der Triplikate bestimmt.

## 2.3. Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1. Extraktion zytoplasmatischer DNA

Mit Hilfe des *High Pure RNA Isolation Kits* wurde die zytoplasmatische Ribonukleinsäure (RNA) aus aufgereinigten B-Lymphozyten extrahiert. Hierzu wurden  $1 \times 10^5$  -  $2 \times 10^6$  Zellen in kaltem PBS gewaschen und anschließend in 200 µl PBS resuspendiert. Durch Zugabe von 400 µl eines Lyse/ Bindepuffers erfolgte die Lyse der Zellen und die gleichzeitige Inaktivierung von RNasen. Die Probe wurde anschließend auf eine Säule mit einem Glasfaservlies gegeben und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. In dem Glasfaservlies der Säule werden Nukleinsäuren gebunden. Die zurückgebliebene DNA wurde durch Zugabe von 100 µl DNase Lösung für 15 min bei Raumtemperatur verdaut. Die verdaute DNA und die DNase wurden durch drei Waschschrte mit Waschpuffer I und II aus dem Vlies der Säule entfernt. Nach Zugabe von 50 µl Elutionspuffer wurde die RNA im letzten Schritt durch Zentrifugation aus dem Vlies herausgelöst. Die extrahierte RNA wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.3.2. Reverse Transkription der RNA in *copy*-DNA

Um über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden zu können, muss die RNA revers transkribiert und in einen *copy*-DNA (cDNA)-Einzelstrang umgeschrieben werden. Hierzu wurde der *First-Strand cDNA Synthesis Kit* verwendet. 8,2 µl der gewonnenen RNA wurden mit 11,8 µl des *First-Strand* Reaktionsmixes für 10 min bei  $25^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend für 60 min auf  $42^\circ\text{C}$  erhitzt. In der ersten Inkubation binden dabei die Primer an die RNA-Matrize, die in der zweiten Inkubation mit Hilfe der AMV (*avian myoblastosis virus*) Reversen Transkriptase zu cDNA transkribiert wird. Danach wurde die AMV Reverse Transkriptase durch fünfminütiges Erhitzen des Reaktionsgemischs auf  $95^\circ\text{C}$  und anschließendes Abkühlen auf  $4^\circ\text{C}$  denaturiert, um eine Kontamination der cDNA zu vermeiden. Die gewonnene cDNA wurde durch Zugabe von destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 µl gebracht und als Ausgangssubstanz für die PCR verwendet.

### 2.3.3. *Real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time*-PCR)

Die Bestimmung der mRNA-Expression von TLR4 und TLR9 mittels *real-time-PCR* wurde dankenswerterweise von Herrn Dr. Thomas Giese (Institut für Immunologie der Universität Heidelberg, D) durchgeführt.

Das Verfahren der PCR ermöglicht es ein spezifisches DNA-Stück aus einem Nukleinsäuregemisch zu amplifizieren. Dieses spezifische DNA-Stück wird auch als *template* bezeichnet. Die Reaktion erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaaren, die den Enden der *templates* homolog sind. Die Reaktion durchläuft drei Schritte: 1. Denaturierung und bei doppelsträngiger DNA Aufschmelzen der beiden Stränge der Matrizen DNA (Denaturierung), 2. spezifische Hybridisierung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNA (Anlagerung) und 3. von den Primern ausgehende DNA-Synthese (Elongation). Das so synthetisierte DNA-Fragment kann in der darauffolgenden Amplifikationsrunde als Matrize für den anderen Primer dienen. Dadurch ist in mehreren aufeinander folgenden Zyklen eine exponentielle Anreicherung einer beliebigen DNA-Sequenz, die zwischen den beiden Primern liegt, möglich. Für die PCR-Reaktion wurde das *LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I Kit* verwendet.

Eine Quantifizierung mittels konventioneller PCR ist nur möglich, solange sich die PCR-Reaktion im linearen Bereich der Amplifikationseffizienz befindet, somit pro Zyklus eine Verdoppelung des entsprechenden templates stattfindet. Mit Hilfe der *real-time-PCR* sind auch quantitative Aussagen außerhalb des linearen Bereichs möglich. Vor Beginn der PCR wird zu jeder Probe ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben, der sich nur an doppelsträngige DNA anlagern kann. Nach jeder Elongationsphase werden die Proben, die sich in Glaskapillaren befinden, mit einem Laser angeregt und emittieren so, proportional zur gebildeten DNA-Menge, ein Signal. Das Fluoreszenzsignal wird mit einer entsprechenden Linse gemessen und von einem Computer gespeichert. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität wird dann gegen die Zykluszahl aufgetragen. Mit geeigneten Referenzproben, deren Kopienzahl bekannt ist, lässt sich schließlich auf die ursprüngliche Kopienzahl in der zu untersuchenden Probe zurückschließen. Um letztlich eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression eines bestimmten Gens zu erhalten, wird die gemessene Kopienzahl auf die Transkriptzahl eines so genannten Referenzgens bezogen, welche in jeder Probe zusätzlich bestimmt wird. Das Referenzgen wird hierbei so gewählt, dass dessen Expression nicht durch den Versuchsansatz beeinflusst wird. In dieser Arbeit wurde  $\beta$ -Aktin als Referenzgen verwendet, welches auch als *housekeeping gene* bezeichnet



---

wird. Die Sequenz der verwendeten Primer für TLR4 und TLR9 ist in Abschnitt 2.1.10. angegeben.

## 2.4. Statistische Analyse

Die Ergebnisse mehrfach durchgeführter Versuche sind als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean*, SEM) dargestellt wird. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der zweiseitige Student-t-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten  $< 0,05$  angenommen und ist durch Markierung mit einem \* angezeigt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm StatView D-4.5 (Abacus Concepts, CA, USA) durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft Cooperation, CA, USA).

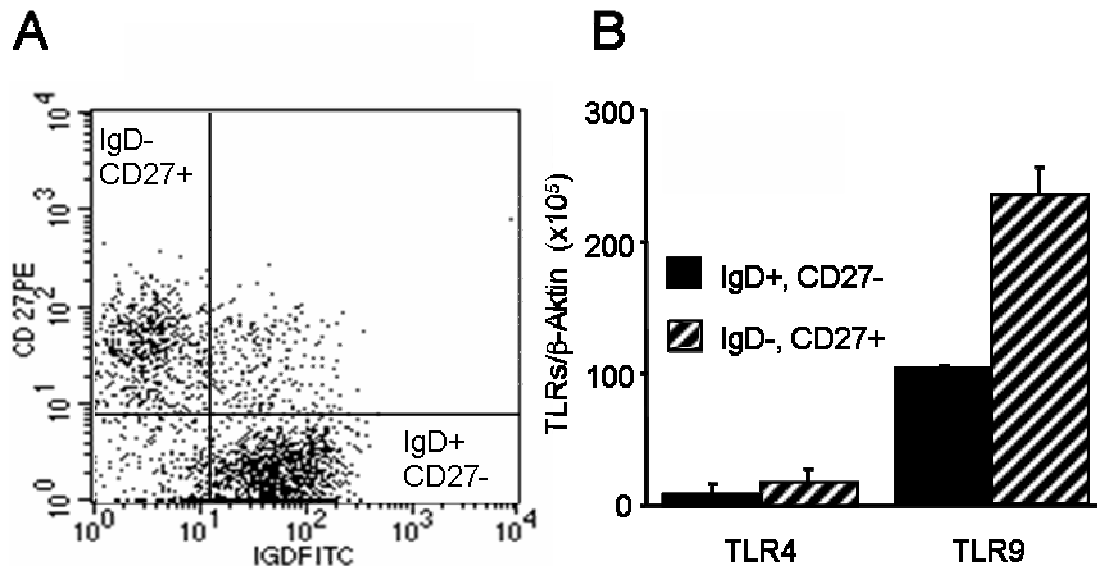
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Expression von TLR4 und TLR9 in naiven B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen

Die Expression von TLR9 ist die entscheidende Voraussetzung zur Erkennung von CpG-DNA [Bauer, 2001]. Über TLR4 erkennen Immunzellen bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), welches ein weit verbreiteter Bestandteil von gramnegativen Bakterien ist [Poltorak, 1998]. Mehrere Studien haben im Vorfeld gezeigt, dass TLR9 im humanen Immunsystem ausschließlich in B-Lymphozyten und PDCs exprimiert wird und dass nur diese beiden Zelltypen direkt durch CpG-Oligonukleotide aktiviert werden können [Hornung, 2002; Krug, 2001]. TLR4 mRNA war dagegen in humanen B-Lymphozyten und PDCs kaum nachweisbar. Es wurde bisher jedoch nicht untersucht, ob sich die Expression von TLR4 und TLR9 innerhalb der Subpopulationen von B-Lymphozyten unterscheidet.

Im peripheren Blut finden sich sowohl naive B-Lymphozyten als auch B-Gedächtniszellen. Zur Auftrennung der B-Lymphozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden Antikörper gegen IgD und CD27 verwendet. IgD wird ausschließlich in naiven B-Lymphozyten gebildet. CD27 dagegen findet sich auf der Zelloberfläche von B-Gedächtniszellen, nicht aber auf naiven B-Lymphozyten. Trennt man anhand dieser Oberflächenmarker die B-Lymphozyten des menschlichen Blutes auf, so erhält man ungefähr 60 % naive B-Lymphozyten (IgD+, CD27-) und 40 % B-Gedächtniszellen (IgD-, CD27+) [Klein, 1998]. Abbildung 1A zeigt die Färbung der B-Lymphozyten mit Antikörpern gegen IgD und CD27 nach der Isolation der B-Lymphozyten aus humanem Spenderblut. Es lassen sich klar die naiven B-Lymphozyten von den B-Gedächtniszellen abgrenzen. Nach der Auftrennung der B-Lymphozyten mit Hilfe der Zellsortierung in der Durchflusszytometrie wurde in den Subpopulationen die Expression von TLR4 und TLR9 in einer quantitativen *real-time*-PCR bestimmt (Abb. 1B).

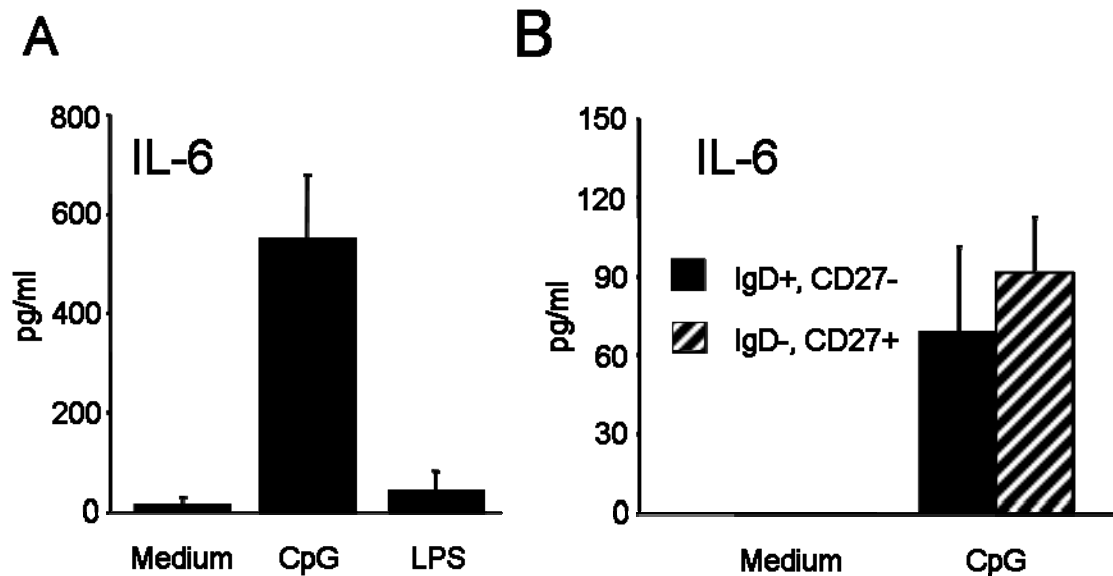
TLR9 konnte in beiden Subpopulationen nachgewiesen werden, wobei das TLR9-Expressionsniveau in naiven B-Lymphozyten geringer war als in B-Gedächtniszellen. TLR4 mRNA ließ sich dagegen in naiven B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen nur in sehr geringen Mengen detektieren (Abb. 1B).



**Abbildung 1: Quantitative Analyse der TLR4 und TLR9 mRNA-Expression in naiven B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen.** (A) B-Lymphozyten wurden per MACS-Technologie aus PBMC isoliert und anschließend mit FACS-Antikörpern gegen IgD und CD27 gefärbt. Gezeigt wird eine repräsentative FACS-Analyse aus zwei unabhängigen Experimenten. (B) Naive B-Lymphozyten (IgD+, CD27-) und B-Gedächtniszellen (IgD-, CD27+) wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie aufgetrennt und in RPMI-Vollmedium inkubiert. Nach drei Stunden in Kultur wurde aus beiden Subpopulationen die zytoplasmatische RNA extrahiert und mit reverser Transkription umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wurde in einer *real-time*-PCR mit Primerpaaren für TLR4 und TLR9 eingesetzt. Die dargestellte TLR-Kopienzahl bezieht sich auf jeweils  $10^5$  Transkripte des *housekeeping gene*  $\beta$ -Aktin. Aus den erhaltenen Daten wurden jeweils die Mittelwerte und der SEM berechnet. Gezeigt werden Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

### 3.2. Erkennung von CpG-Oligonukleotiden und mikrobiellem Lipopolysaccharid durch B-Lymphozyten

Aufbauend auf den oben genannten Befunden sollte gezeigt werden, dass der TLR9-Ligand CpG-ODN 2006, nicht aber der TLR4-Ligand LPS, B-Lymphozyten direkt stimulieren kann. Hierzu wurde Interleukin-6 als repräsentativer Marker für die Aktivierung der B-Lymphozyten untersucht. Die geringe TLR4 mRNA-Expression in B-Lymphozyten legte nahe, dass diese nur schwach auf LPS reagieren. Tatsächlich ließ sich nur sehr wenig Interleukin-6 nachweisen, wenn B-Lymphozyten mit LPS inkubiert wurden (Abb. 2A). Dagegen war CpG-ODN ein potenter Stimulus für B-Lymphozyten und induzierte eine starke Synthese von Interleukin-6. Entsprechend der TLR9 mRNA-Expression wurden sowohl naive B-Lymphozyten als auch B-Gedächtniszellen durch CpG-ODN aktiviert und produzierten annähernd gleiche Mengen an Interleukin-6 (Abb. 2B).



**Abbildung 2: Die Produktion von Interleukin-6 in aufgereinigten B-Lymphozyten nach Stimulation mit CpG-ODN und LPS.** (A) B-Lymphozyten wurden per MACS-Technologie aus PBMC isoliert und mit CpG-ODN, LPS oder ohne Stimulus inkubiert. Nach drei Tagen wurde Interleukin-6 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten wurden zu Mittelwerten zusammengefasst und mit dem korrespondierenden SEM dargestellt. (B) Naive B-Lymphozyten (IgD+, CD27-) und B-Gedächtniszellen (IgD-, CD27+) wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie aufgetrennt. Anschließend wurden sie für drei Tage mit CpG-ODN oder ohne Stimulus inkubiert. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen wurden zu Mittelwerten zusammengefasst und mit dem korrespondierenden SEM dargestellt.

### 3.3. Die Regulation der Zytokinsynthese durch CpG-Oligonukleotide und CD40 Ligand in B-Lymphozyten

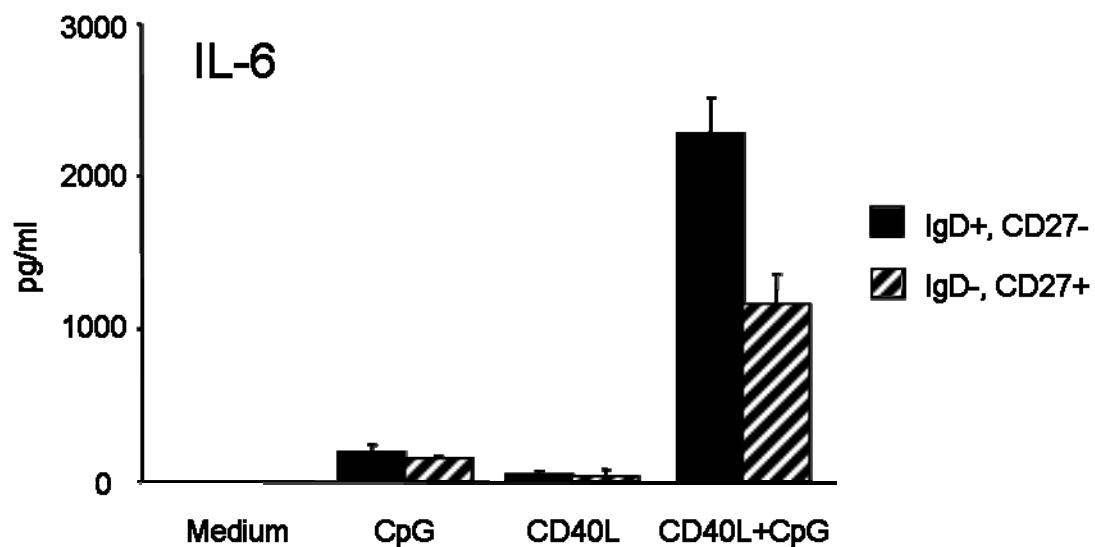
#### 3.3.1. Die Regulation der Synthese von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- $\alpha$

Die Bindung von CD40 Ligand, welcher auf T-Helferzellen exprimiert wird, an das Oberflächenmolekül CD40 auf den B-Lymphozyten spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung eines B-Lymphozyten in Richtung Plasmazelle oder B-Gedächtniszelle [Lane, 1992]. *In vitro* lässt sich das Zusammentreffen von T-Helferzelle und B-Lymphozyten mit Hilfe von CD40 Ligand-transfizierten Fibroblasten (im Weiteren als CD40L bezeichnet) nachstellen. Der CD40 Ligand auf der Zelloberfläche der Fibroblasten bindet an CD40 auf dem B-Lymphozyten und simuliert so die Anwesenheit einer T-Helferzelle.

Bei CD40L und CpG-ODN handelt es sich um starke Aktivatoren der B Lymphozyten. Daher sollten CD40L und CpG-ODN auch wesentlich die Zytokinsynthese der B-Lymphozyten beeinflussen. B-Lymphozyten wurden nach der Isolation aus

humanem Spenderblut in naive B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen aufgetrennt. Diese wurden für drei Tage in Gegenwart von CpG-ODN, CD40L, der Kombination von CpG-ODN und CD40L oder ohne Stimulus in Kultur gegeben.

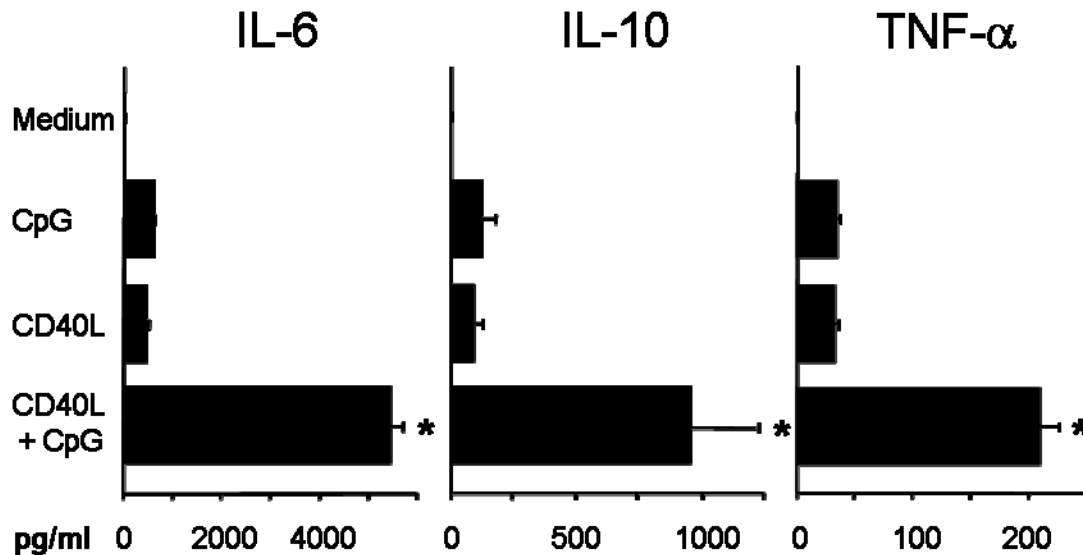
Abbildung 3 zeigt, dass CpG-ODN und CD40L alleine vergleichbare Mengen an Interleukin-6 in naiven B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen induzieren. Wurde sowohl CpG-ODN als auch CD40L in die Kultur gegeben, so bewirkte dies eine synergistische Steigerung der Produktion von Interleukin-6. Dieses Zytokinprofil konnte in beiden Subpopulationen der B-Lymphozyten beobachtet werden.



**Abbildung 3: CpG-ODN und CD40L induzieren synergistisch die Produktion von Interleukin-6 in naiven B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen.** B-Lymphozyten wurden per MACS-Technologie aus PBMC isoliert und anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie in naive B-Lymphozyten (IgD+, CD27-) und B-Gedächtniszellen (IgD-, CD27+) aufgetrennt. Die beiden Subpopulationen der B-Lymphozyten wurden mit CpG-ODN, CD40L, der Kombination von CpG-ODN und CD40L oder ohne Stimulus inkubiert. Am dritten Tag wurde Interleukin-6 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen wurden zu Mittelwerten zusammengefasst und mit dem korrespondierenden SEM dargestellt.

In den folgenden Experimenten wurde auf eine Auftrennung der B-Lymphozyten in naive B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen verzichtet, da dies mit einem erheblichen Aufwand und Zellverlust verbunden war. Bei der Analyse weiterer Zytokine wurden aufgereinigte B-Lymphozyten mit folgenden Bedingungen angesetzt: CpG-ODN, CD40L, die Kombination von CpG-ODN und CD40L oder ohne Stimulus. CpG-ODN und CD40L alleine induzierten nur geringe Mengen an Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- $\alpha$  (Abb. 4). Erst bei gleichzeitiger Zugabe von CpG-ODN und CD40L war eine maximale Produktion von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- $\alpha$  nachweisbar. Da in der Vergangenheit auch über die Synthese von Interleukin-4 und

Interferon- $\gamma$  berichtet wurde [Lund, 2005], wurden auch diese Zytokine im Überstand bestimmt. Es wurde allerdings unter keiner Bedingung die Bildung von Interleukin-4 und Interferon- $\gamma$  nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4: CpG-ODN und CD40L induzieren in B-Lymphozyten synergistisch die Produktion von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- $\alpha$ .** Isolierte B-Lymphozyten wurden mit CpG-ODN, CD40L, der Kombination von CpG-ODN und CD40L oder ohne Stimulus inkubiert. Am dritten Tag wurde Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- $\alpha$  im Überstand mittels ELISA bestimmt. Aus den erhaltenen Daten wurden jeweils die Mittelwerte gebildet und der SEM berechnet. Gezeigt werden Daten aus drei (Interleukin-6 und TNF- $\alpha$ ) bzw. fünf (Interleukin-10) unabhängigen Experimenten. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu CpG-ODN oder CD40L

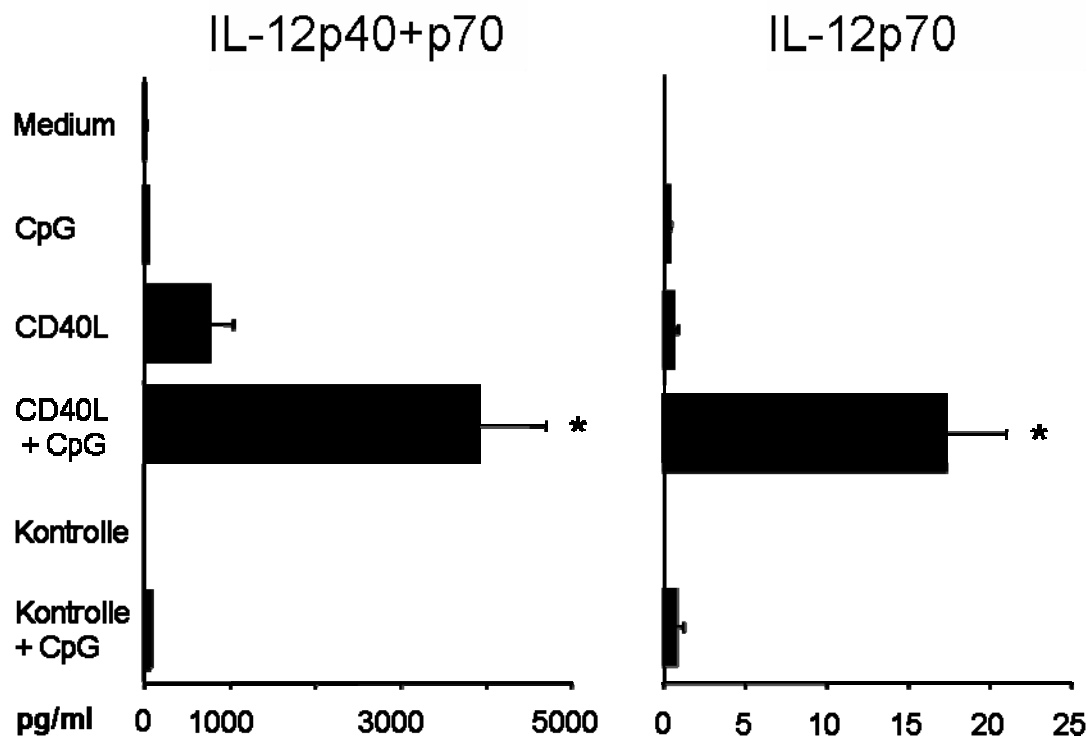
### 3.3.2. Die Regulation der Synthese von Interleukin-12

#### 3.3.2.1. Die Induktion von Interleukin-12p70 erfordert sowohl CpG-ODN als auch CD40L

Wie zur Analyse der vorher genannten Zytokine wurden B-Lymphozyten aus peripherem humanem Spenderblut aufgereinigt und mit verschiedenen Stimuli inkubiert. Zur Messung von Interleukin-12 im Überstand wurden zwei verschiedene ELISA-Kits verwendet, um zwischen dem biologisch inaktiven Interleukin-12p40 und dem biologisch aktiven Heterodimer Interleukin-12p70 unterscheiden zu können. Einer der verwendeten ELISA-Kits war spezifisch für das biologisch aktive Heterodimer Interleukin-12p70. Der andere ELISA-Kit detektierte sowohl Interleukin-12p70 als auch das biologisch inaktive Interleukin-12p40.

CpG-ODN alleine konnte weder Interleukin-12p40 noch das biologisch aktive Interleukin-12p70 induzieren (Abb. 5). Die Stimulation mit CD40L bewirkte zwar die

Synthese von Interleukin-12p40, das biologisch aktive Interleukin-12p70 war jedoch nicht nachweisbar. Bei gleichzeitiger Zugabe von CpG-ODN und CD40L produzierten B-Lymphozyten neben erheblichen Mengen an Interleukin-12p40 auch das biologisch aktive Interleukin-12p70. Somit nimmt Interleukin-12p70 unter den Zytokinen, die von B-Lymphozyten sezerniert werden, eine Sonderstellung ein. Interleukin-12p70 wird nur gebildet, wenn B-Lymphozyten sowohl über CD40L aktiviert werden als auch mit dem mikrobiellen Stimulus CpG-ODN in Kontakt kommen.

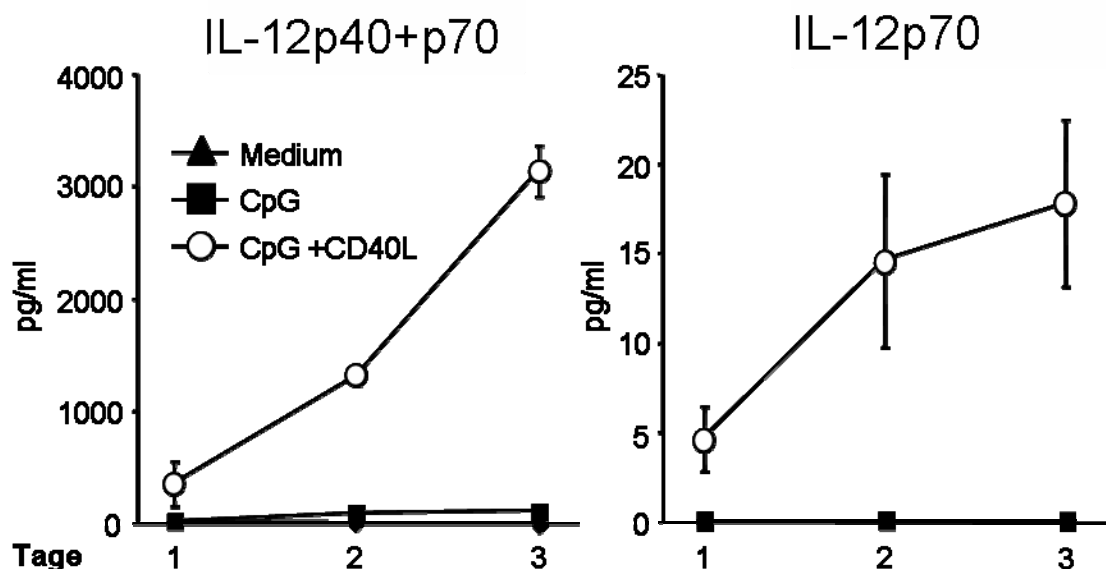


**Abbildung 5: Die Induktion von Interleukin-12p70 in B-Lymphozyten erfordert sowohl CpG-ODN als auch CD40L.** Isolierte B-Lymphozyten wurden mit CpG-ODN, CD40L, der Kombination von CpG-ODN und CD40L oder ohne Stimulus inkubiert. Zudem wurden neben den CD40 Ligand-transfizierten Fibroblasten auch Fibroblasten eingesetzt, die nicht mit CD40 Ligand transfiziert waren („Kontrolle“). Nach drei Tagen wurde im Überstand Interleukin-12p40+p70 und Interleukin-12p70 mittels ELISA bestimmt. Ergebnisse aus neun unabhängigen Versuchen wurden zu Mittelwerten zusammengefasst und mit dem korrespondierenden SEM dargestellt. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu CpG-ODN oder CD40L.

Da die Stimulation der B-Lymphozyten mit Hilfe von CD40 Ligand-transfizierten Fibroblasten durchgeführt wurde, war es möglich, dass die alleinige Anwesenheit der Fibroblasten eine Zytokinproduktion bewirkte. Um den Einfluss der Fibroblasten auf die Zytokinproduktion zu kontrollieren, wurden neben den CD40 Ligand-transfizierten Fibroblasten auch Fibroblasten eingesetzt, die nicht mit CD40 Ligand transfiziert waren (sie werden hier als „Kontroll“-Fibroblasten bezeichnet). Wie in Abbildung 5 zu

erkennen war die Stimulation mit diesen „Kontroll“-Fibroblasten nicht ausreichend, um eine Synthese von Interleukin-12 hervorzurufen.

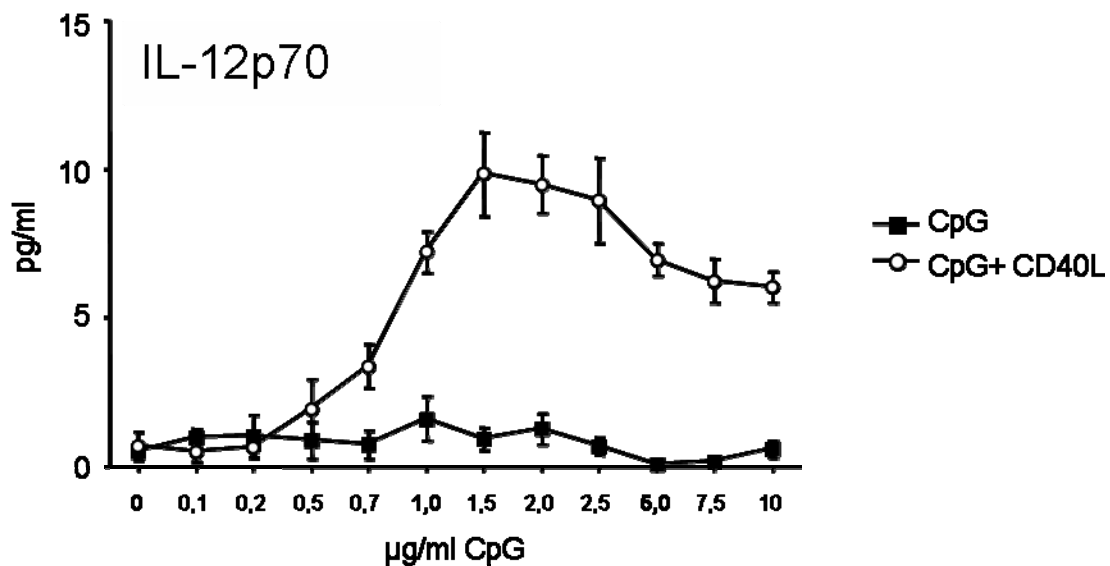
In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt der Kultur die B-Lymphozyten Interleukin-12 bilden und welche Konzentration an CpG-ODN zur maximalen Induktion von Interleukin-12p70 nötig ist. Abbildung 6 stellt die Kinetik von Interleukin-12p40+p70 und Interleukin-12p70 dar. Die maximale Konzentration an Interleukin-12 konnte nach drei Tagen gemessen werden. Somit produzieren B-Lymphozyten bei gleichzeitiger Anwesenheit von CD40L und CpG-ODN über den gesamten Zeitraum von drei Tagen sowohl Interleukin-12p40 als auch Interleukin-12p70.



**Abbildung 6: Kinetik der Produktion von Interleukin-12 in aufgereinigten B-Lymphozyten.** Isolierte B-Lymphozyten wurden für drei Tage mit CpG-ODN oder der Kombination von CpG-ODN und CD40L inkubiert. Nach einem, zwei und drei Tagen erfolgte die Messung von Interleukin-12p40+p70 und Interleukin-12p70 im Überstand mittels ELISA. Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen wurden zu Mittelwerten zusammengefasst und mit dem korrespondierenden SEM dargestellt.

Zum Nachweis der optimalen Konzentration von CpG-ODN für die Induktion von Interleukin-12p70 wurden aufgereinigte B-Lymphozyten in Anwesenheit und Abwesenheit von CD40L mit unterschiedlichen Mengen an CpG-ODN inkubiert. Bei gleichzeitiger Stimulation mit CD40L wurde eine maximale Produktion von Interleukin-12p70 bei einer CpG-ODN-Konzentration zwischen 1,5 und 5,0 µg/ ml induziert (Abb. 7). Die bisher verwendete CpG-ODN-Konzentration von 3,0 µg/ ml lag somit im optimalen Bereich.



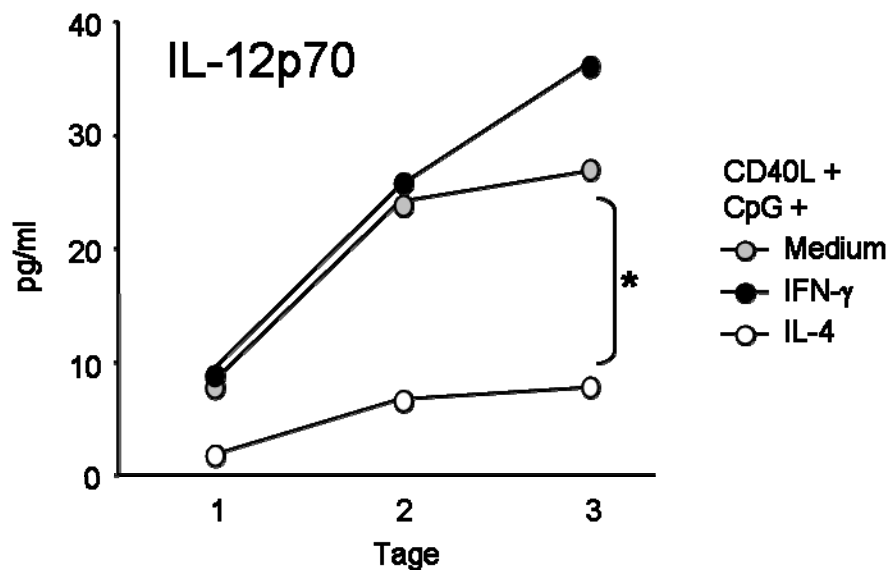


**Abbildung 7: Bestimmung der optimalen CpG-ODN-Konzentration zur Induktion von Interleukin-12p70 in aufgereinigten B-Lymphozyten.** Isolierte B-Lymphozyten wurden in An- und Abwesenheit von CD40L mit verschiedenen Konzentrationen an CpG-ODN inkubiert. Nach drei Tagen wurde Interleukin-12p70 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Aus den erhaltenen Daten wurden jeweils die Mittelwerte und der SEM berechnet. Gezeigt werden Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.3.2.2. Interleukin-4 inhibiert die Bildung von Interleukin-12p70 in B-Lymphozyten

Interleukin-4 ist als eines der potentesten Zytokine zur Induktion einer  $T_H2$ -Immunantwort bekannt [McKenzie, 2000]. Es führte jedoch auch zu einer verstärkten Produktion des  $T_H1$ -Zytokins Interleukin-12 in dendritischen Zellen [Yao, 2005]. Welchen Einfluss Interleukin-4 auf die Bildung von Interleukin-12 in B-Lymphozyten hat, wurde in dem folgenden Experiment untersucht.

Aufgereinigte B-Lymphozyten wurden mit CD40L und CpG-ODN für drei Tage in Kultur gegeben. Wie bereits bekannt, war Interleukin-12p70 im Überstand nachweisbar (Abb. 8). Die Zugabe von Interleukin-4 zu Beginn der Kultur führte zu einer signifikanten Hemmung der Produktion von Interleukin-12p70 in B-Lymphozyten. Interferon- $\gamma$ , ein  $T_H1$ -Zytokin, hatte dagegen einen schwach verstärkenden Effekt auf die Bildung von Interleukin-12p70.



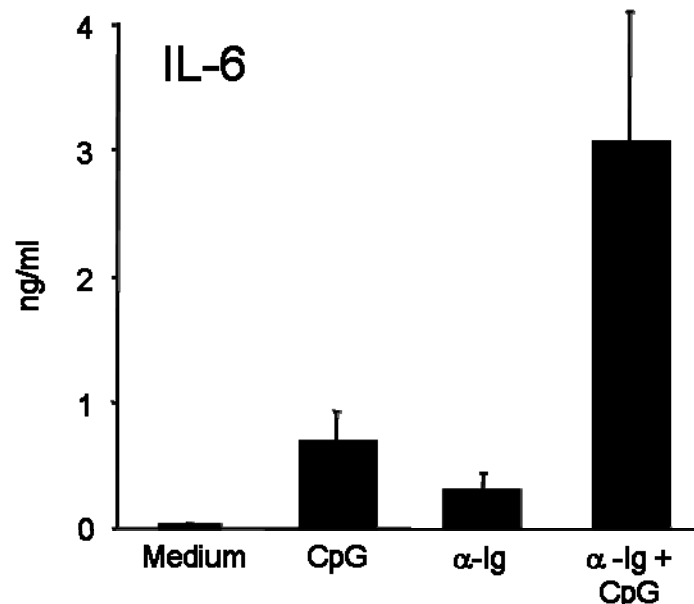
**Abbildung 8: Einfluss von Interleukin-4 und Interferon- $\gamma$  auf die Produktion von Interleukin-12p70 in aufgereinigten B-Lymphozyten.** Isolierte B-Lymphozyten wurden mit der Kombination von CD40L und CpG-ODN. Zusätzlich wurde wie angegeben Interleukin-4 oder Interferon- $\gamma$  zu Kulturbeginn zugegeben. Nach einem, zwei und drei Tagen wurde im Überstand Interleukin-12p70 mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kombination von CD40L und CpG-ODN

### 3.3.2.3. Die Quervernetzung des Antigenrezeptors spielt keine Rolle in der Regulation der Synthese von Interleukin-12

Reife B-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche Immunglobuline, welche als Antigenrezeptor dienen. Die Quervernetzung dieser Antigenrezeptoren durch Antigene ist ein wichtiges Signal zur Aktivierung der B-Lymphozyten. Es war daher zu erwarten, dass auch die Zytokinsynthese der B-Lymphozyten maßgeblich durch die Quervernetzung des Antigenrezeptors beeinflusst wird. *In vitro* wurde die Quervernetzung durch die Verwendung von Antikörpern ( $\alpha$ -Ig) gegen den Fc-Teil des Antigenrezeptors erreicht.

Die Aktivierung der B-Lymphozyten mit  $\alpha$ -Ig führte zu Bildung von Interleukin-6 (Abb. 9). Wurden die B-Lymphozyten gleichzeitig mit  $\alpha$ -Ig und CpG-ODN stimuliert, so kam es zu einer verstärkten Interleukin-6-Sekretion. Die Quervernetzung des Antigenrezeptors durch  $\alpha$ -Ig war aber im Gegensatz zu CD40L nicht in der Lage, Interleukin-12p40 zu induzieren (Abb. 10B). Auch führte die gleichzeitige Gabe von  $\alpha$ -Ig und CpG-ODN weder zur Synthese von Interleukin-12p40 noch zur Bildung von Interleukin-12p70 (Abb. 10A und 10B). Interleukin-12p70 wurde nur sezerniert, wenn B-Lymphozyten gleichzeitig mit CpG-ODN und CD40L stimuliert wurden. Die

Quervernetzung des Antigenrezeptors durch  $\alpha$ -Ig hatte somit keinen Einfluss auf die Synthese von Interleukin-12 in B-Lymphozyten.

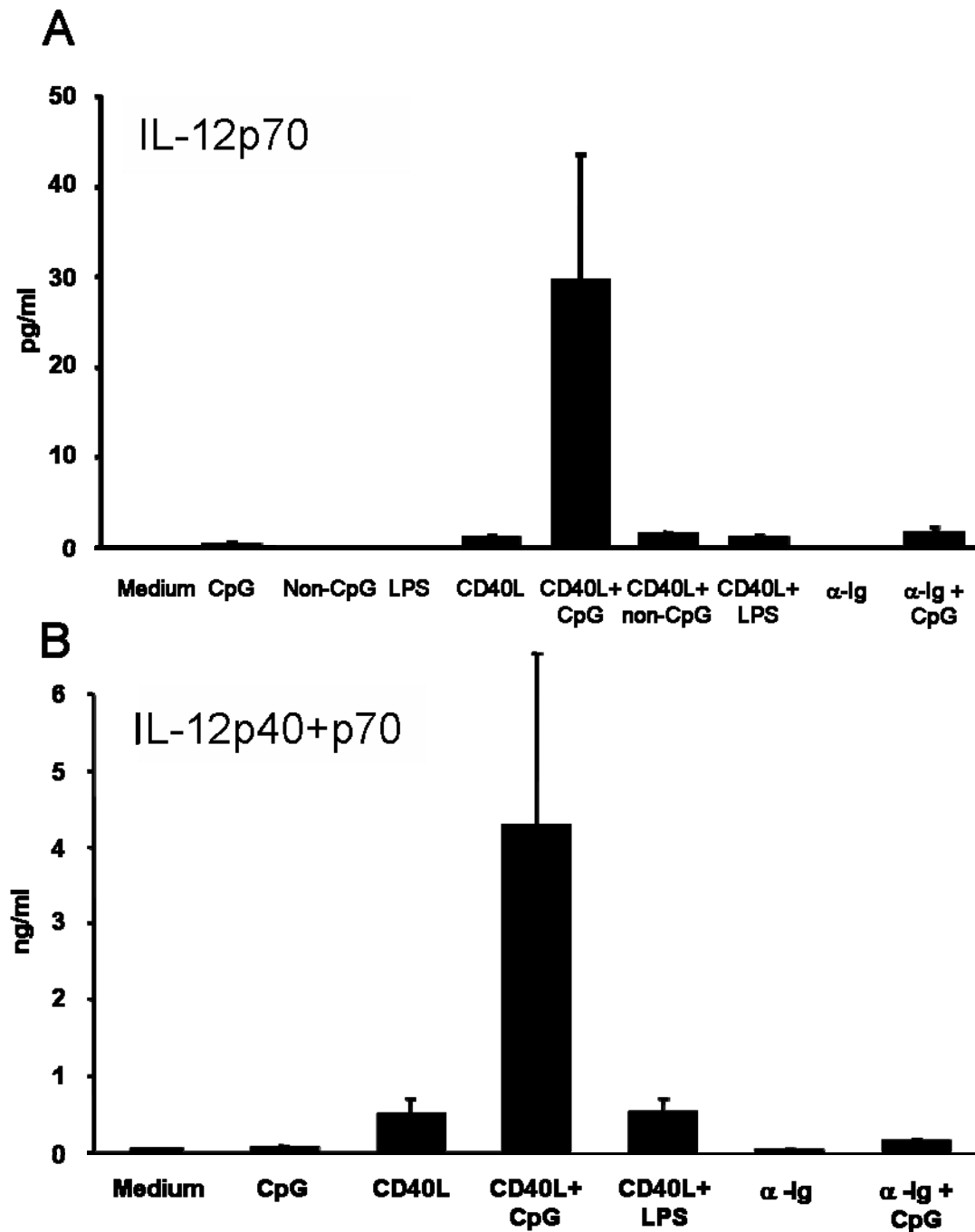


**Abbildung 9: Die Quervernetzung des Antigenrezeptors reguliert die Synthese von Interleukin-6 in B-Lymphozyten.** Isolierte B-Lymphozyten wurden mit CpG-ODN,  $\alpha$ -Ig oder mit der Kombination von  $\alpha$ -Ig und CpG-ODN inkubiert. Nach drei Tagen wurde im Überstand Interleukin-6 mittels ELISA bestimmt. Aus den erhaltenen Daten wurde jeweils der Mittelwert und der SEM berechnet. Gezeigt werden Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 3.3.2.4. LPS hat keinen Einfluss auf die Synthese von Interleukin-12 in B-Lymphozyten

Wie bereits in Abbildung 2A gezeigt wurde, wird LPS von B-Lymphozyten nicht erkannt und führt zu keiner Bildung von Interleukin-6. Es wäre allerdings möglich, dass die Aktivierung der B-Lymphozyten mit CD40L zu einer veränderten Signalübertragung oder verstärkten Expression von TLR4 führt und somit die B-Lymphozyten auf LPS reagieren können.

Aufgereinigte B-Lymphozyten wurden mit verschiedenen Kombinationen von CpG-ODN, LPS,  $\alpha$ -Ig und CD40L inkubiert. Nach drei Tagen wurde im Überstand Interleukin-12p70 bestimmt (Abb. 10A). Die gleichzeitige Zugabe von CpG-ODN und CD40L regte wie erwartet die Bildung von Interleukin-12p70 an. LPS wurde von B-Lymphozyten nicht erkannt und bewirkte weder alleine noch in Gegenwart von CD40L die Produktion von Interleukin-12p70. Auch die Synthese von Interleukin-12p40 wurde nicht durch die Zugabe von LPS gesteigert (Abb. 10B).



**Abbildung 10: Die Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors und LPS spielen keine Rolle in der Regulation der Interleukin-12-Synthese in B-Lymphozyten.** Isolierte B-Lymphozyten wurden mit verschiedenen Stimuli inkubiert (CpG-ODN, LPS,  $\alpha$ -Ig, CD40L und Non-CpG-ODN). Nach drei Tagen wurde im Überstand Interleukin-12p70 (A) und Interleukin-12p40+p70 (B) bestimmt. Aus den erhaltenen Daten wurden jeweils die Mittelwerte und der SEM berechnet. Gezeigt werden Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

Bei dem in Abbildung 10A dargestellten Versuch wurde zudem ein Oligonukleotid verwendet, welches keine CG-Dinukleotide enthält (Non-CpG-ODN). Hiermit sollte nachgewiesen werden, dass die Induktion der Zytokine von den CpG-Motiven abhängig ist und nicht etwa durch die Phosphothioat-Bindungen der Oligonukleotide

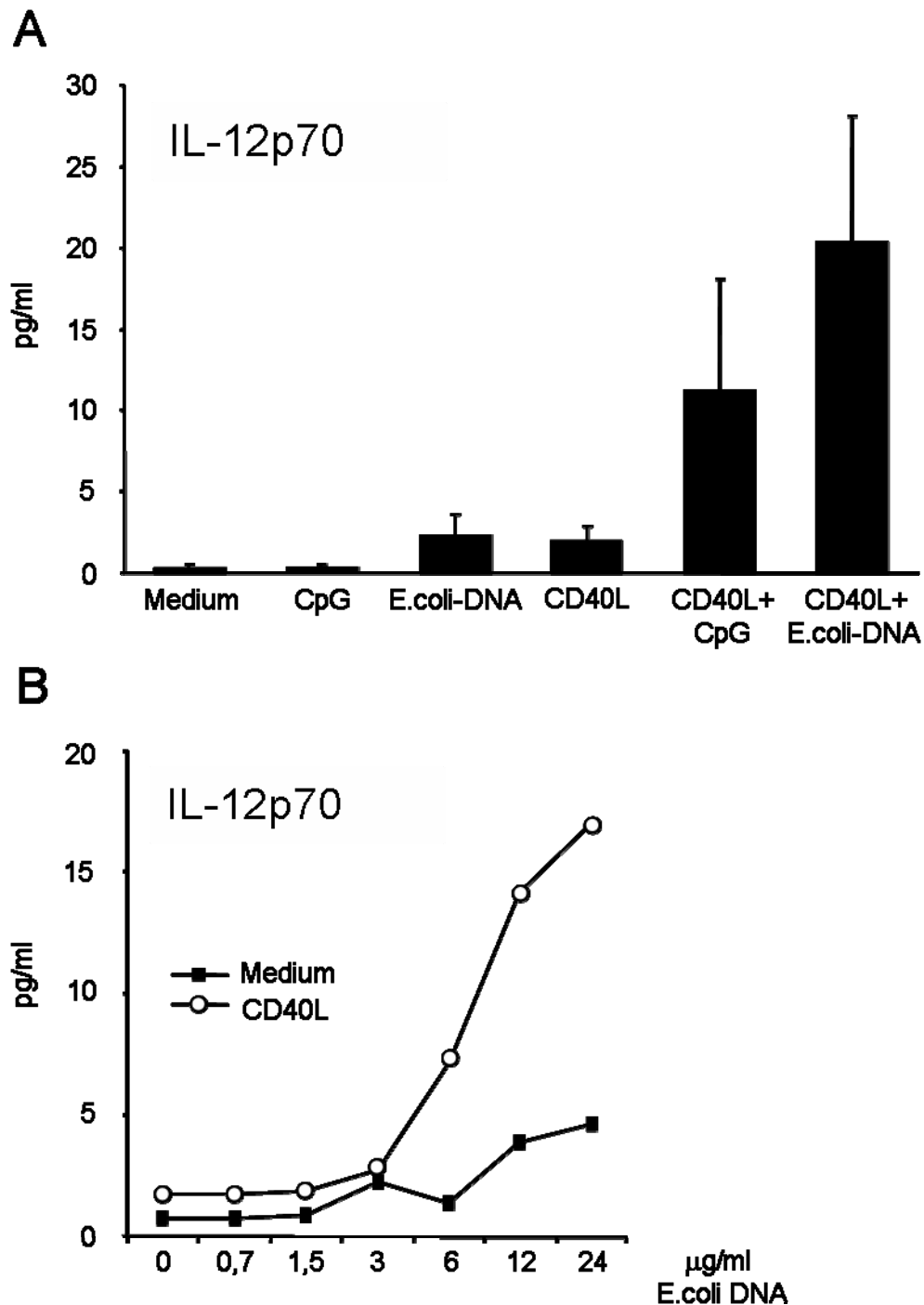
oder andere Störfaktoren hervorgerufen wird. Das Non-CpG-ODN hatte keinen Einfluss auf die Zytokinsynthese, womit gezeigt werden konnte, dass die CpG-Motive innerhalb des Oligonukleotids für die Aktivierung der B-Lymphozyten verantwortlich sind.

#### 3.3.2.5. Mikrobielle DNA führt wie CpG-ODN in Gegenwart von CD40L zur Produktion von Interleukin-12p70 in B-Lymphozyten

Die Verwendung der synthetischen CpG-Oligonukleotiden dient als Modell einer Aktivierung von Immunzellen durch mikrobielle DNA. Daher sollten sich die Effekte, die bei der Verwendung von CpG-ODN beobachtet werden, auch mit mikrobieller DNA nachweisen lassen. Für das folgende Experiment wurde bakterielle DNA verwendet, die aus Kulturen von *Escherichia coli* (*E. coli*) isoliert wurde. Bakterielle DNA ist im Gegensatz zu den synthetischen Phosphothioat-Oligonukleotiden nicht vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt. Daher musste während eines Versuches mehrfach im Abstand von einigen Stunden *E. coli*-DNA zugegeben werden.

Die Aktivierung von aufgereinigten B-Lymphozyten mit *E. coli*-DNA war alleine bereits ausreichend, um eine geringe Produktion von Interleukin-12p70 hervorzurufen (Abb. 11A). Dies war überraschend, da CpG-ODN alleine keine Synthese von Interleukin-12p70 bewirkte. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten war in diesem Experiment Interleukin-12p70 in geringen Mengen (< 3 pg/ ml) auch bei alleiniger Anwesenheit von CD40L nachweisbar. In Gegenwart von CD40L induzierte sowohl CpG-ODN als auch *E. coli*-DNA die Bildung von Interleukin-12p70. Dieser Versuch bestätigte die Hypothese, dass die Anwesenheit von bakterieller DNA die Produktion von Interleukin-12p70 in B-Lymphozyten ermöglicht.

Wie für CpG-ODN sollte auch für *E. coli*-DNA die Konzentration ermittelt werden, die zur maximalen Induktion von Interleukin-12p70 nötig ist. Aufgereinigte B-Lymphozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *E. coli*-DNA in An- und Abwesenheit von CD40L inkubiert (Abb. 11B). Im Gegensatz zu CpG-ODN (Abb. 7) konnte keine optimale Konzentration an *E. coli*-DNA bestimmt werden, da auch bei der verwendeten Höchstkonzentration von 24 µg/ ml noch kein Maximum der Produktion von Interleukin-12p70 erreicht war.

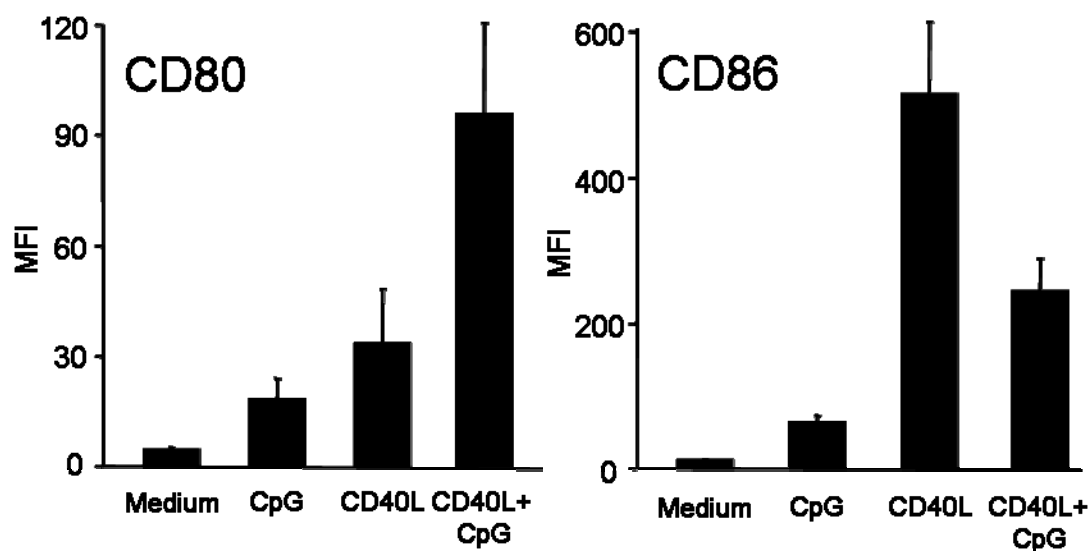


**Abbildung 11: DNA aus *Escherichia coli* führt wie CpG-ODN in Gegenwart von CD40L zur Produktion von Interleukin-12p70 in B-Lymphozyten.** (A) Isolierte B-Lymphozyten wurden mit verschiedenen Kombinationen von CpG-ODN, CD40L und *E. coli*-DNA inkubiert. *E. coli*-DNA wurde hierbei mehrfach nach 0h, 2h, 4h und 16h in einer Konzentration von 24 µg/ml zugegeben. Nach drei Tagen wurde im Überstand Interleukin-12p70 mittels ELISA bestimmt. Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen wurden zu Mittelwerten zusammengefasst und mit dem korrespondierenden SEM dargestellt. (B) Isolierte B-Lymphozyten wurden in An- und Abwesenheit von CD40L mit verschiedenen Konzentrationen von *E. coli*-DNA inkubiert. Wiederum wurde *E. coli*-DNA nach 0h, 2h, 4h und 16h zugegeben. Nach drei Tagen wurde im Überstand Interleukin-12p70 mittels ELISA bestimmt. Gezeigt werden Daten aus einem Experiment.

### 3.4. Einfluss von CpG-aktivierten B-Lymphozyten auf die Immunantwort der T-Lymphozyten

#### 3.4.1. Expression von kostimulatorischen Molekülen auf B-Lymphozyten

Ruhende B-Lymphozyten tragen kaum kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche und können somit naive T-Lymphozyten nicht aktivieren [Ho, 1994]. Werden B-Lymphozyten dagegen durch CD40L aktiviert, exprimieren sie CD80 und CD86 und werden zu potenten antigenpräsentierenden Zellen [Lapointe, 2003; Schultze, 1997]. In dem folgenden Experiment wurde untersucht, wie CD80 und CD86 durch CpG-ODN und CD40L reguliert werden.



**Abbildung 12: Regulation der Expression von CD80 und CD86 durch CpG-ODN und CD40L.** Isolierte B-Lymphozyten wurden mit CpG-ODN, CD40L, der Kombination von CD40L und CpG-ODN oder ohne Stimulus kultiviert. Nach drei Tagen wurden die Zellen geerntet und die Expression von CD80 und CD86 in der FACS-Analyse bestimmt. Die Ergebnisse aus sechs unabhängigen Versuchen wurden zu Mittelwerten zusammengefasst und mit dem korrespondierenden SEM dargestellt.

CpG-ODN alleine hatte nur eine geringe Wirkung auf die Expression von CD80 und CD86. Die Stimulation mit CD40L führte dagegen zu einer starken Expression von CD86 und einer mäßig gesteigerten Expression von CD80. Wurden die B-Lymphozyten sowohl über CpG-ODN als auch über CD40L aktiviert, so fanden sich zwar weniger CD86-Moleküle auf der Oberfläche als bei der alleinigen Stimulation mit CD40L, dafür stieg aber die Expression von CD80 deutlich an. Dieser Versuch zeigte,

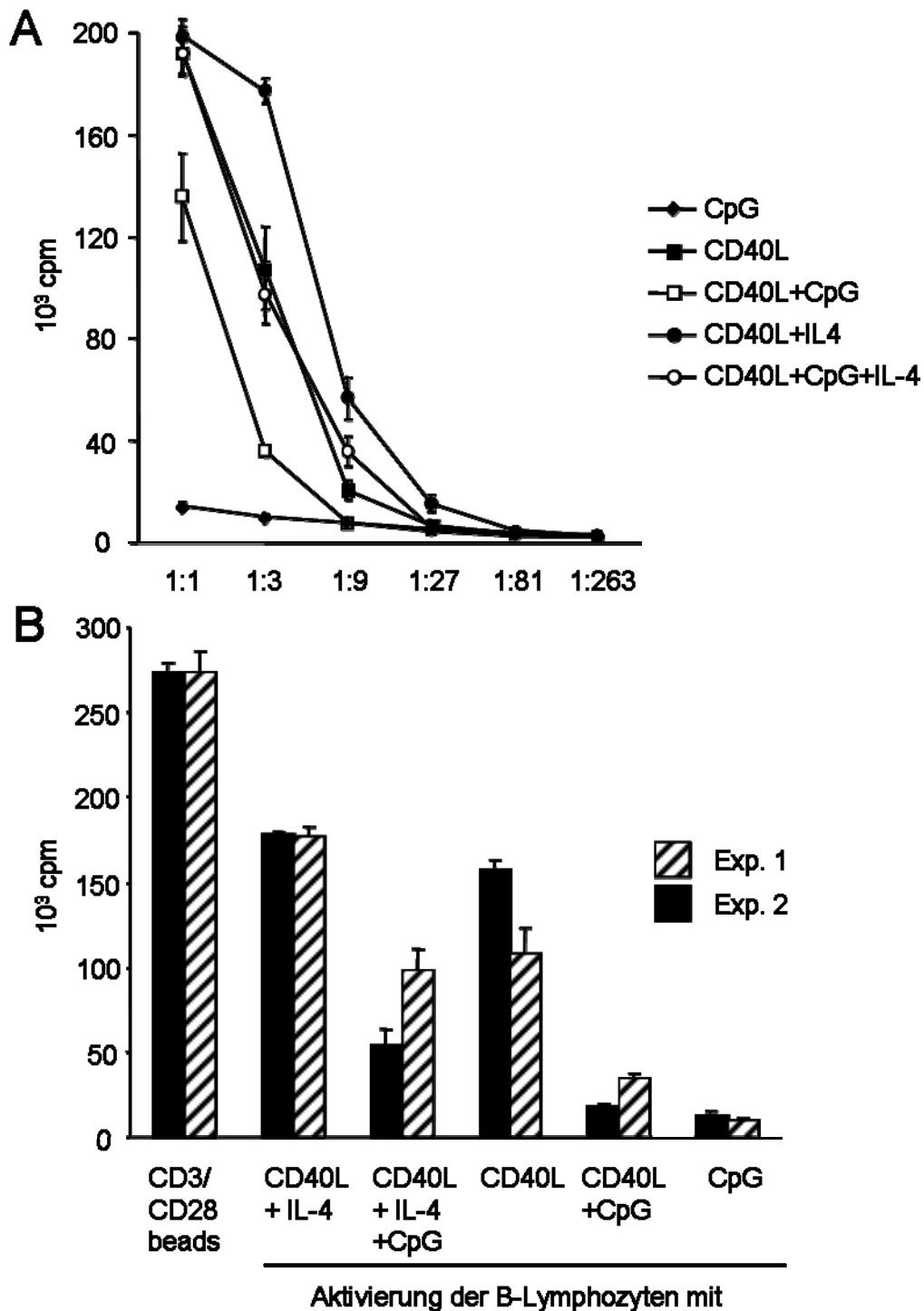
dass aktivierte B-Lymphozyten kostimulatorische Moleküle exprimieren. Besonders nach Stimulation mit CD40L oder der Kombination von CD40L und CpG-ODN können sie daher als antigenpräsentierende Zellen dienen.

### 3.4.2. Aktivierte B-Lymphozyten induzieren Proliferation in alloenen T-Lymphozyten

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, inwieweit CpG-ODN die Fähigkeit der B-Lymphozyten beeinflusst in alloenen T-Lymphozyten eine Proliferation zu induzieren. Hierzu wurden aufgereinigte B-Lymphozyten mit CpG-ODN, CD40L, der Kombination von CD40L und CpG-ODN, der Kombination von CD40L und Interleukin-4 oder der Kombination von CD40L, CpG-ODN und Interleukin-4 inkubiert. Nach drei Tagen wurden die B-Lymphozyten geerntet, mit 50 Gray bestrahlt, gezählt und mit alloenen T-Lymphozyten in Kultur gegeben.

Die T-Lymphozyten binden in diesem Kultursystem mit ihrem T-Zell-Rezeptor an die MHC-Moleküle der alloenen B-Lymphozyten. Dies dient als vereinfachtes Modell einer Situation *in vivo*, in der B-Lymphozyten den T-Lymphozyten deren spezifisches Antigen präsentieren. Die Proliferation der T-Lymphozyten wurde am Ende der Kokultur mit Hilfe des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assays bestimmt. B-Lymphozyten, die zuvor mit CD40L und Interleukin-4 stimuliert wurden, induzierten eine starke Proliferation der T-Lymphozyten (Abb. 13A und 13B). Ebenso waren B-Lymphozyten, die nur mit CD40L, der Kombination von CD40L und CpG-ODN oder der Kombination von CD40L, CpG-ODN und Interleukin-4 aktiviert wurden, gute kostimulatorische Zellen und führten zu hohen Zellteilungsrate der T-Lymphozyten. Wurden B-Lymphozyten dagegen nur mit CpG-ODN inkubiert, bevor sie mit den T Lymphozyten kultiviert wurden, konnten sie keine Proliferation der T-Lymphozyten hervorrufen. Um das Ausmaß der Zellteilung der T-Lymphozyten abzuschätzen, wurden anti-CD3/ anti-CD28 Microbeads verwendet. Hierbei handelt es sich Partikel mit einem Durchmesser von 4,5 µm, die mit stimulierenden Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichtet sind (CD3/ CD28 Microbeads). Im Vergleich zur Proliferation, die mit der Kombination von CD3/ CD28 Microbeads mit Interleukin-2 erreicht wurde, war die mit Hilfe von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten induzierte Zellteilungsrate um etwa die Hälfte geringer (Abb. 13B). Die mit der Kombination von CD40L und CpG-ODN stimulierten B-Lymphozyten zeigten dagegen nur einen relativ schwachen kostimulatorischen Effekt.





**Abbildung 13: CD40L-aktivierte B-Lymphozyten induzieren Proliferation in allogenen B-Lymphozyten.** Isolierte B-Lymphozyten wurden mit verschiedenen Kombinationen von CpG-ODN, CD40L und Interleukin-4 aktiviert. Nach drei Tagen wurden die B-Lymphozyten geerntet, gewaschen, bei 50 Gray bestrahlt und gezählt. (A) Allogene T-Lymphozyten wurden im angegebenen B-Lymphozyten:T-Lymphozyten Verhältnis für sieben Tage mit den voraktivierten und bestrahlten B-Lymphozyten in Kultur gegeben. Zur Bestimmung der Proliferation der T-Lymphozyten wurden der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Assay durchgeführt. (B) Vor-aktivierte und bestrahlte B-Lymphozyten wurden mit allogenen T-Lymphozyten im Verhältnis 1: 3 inkubiert. Zudem wurden in einer Bedingung die T-Lymphozyten mit der Kombination von anti-CD3/ anti-CD28 Mikrobeads und Interleukin-2 aktiviert. Zur Bestimmung der Proliferation der T-Lymphozyten wurde wiederum der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Assay durchgeführt. Jede Bedingung der oben beschriebenen Versuche wurde in Triplikaten angesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert der Triplikate mit dem korrespondierenden SEM dargestellt.

### 3.4.3. Aktivierte B-Lymphozyten induzieren in naiven allogenen T-Lymphozyten eine starke Proliferation

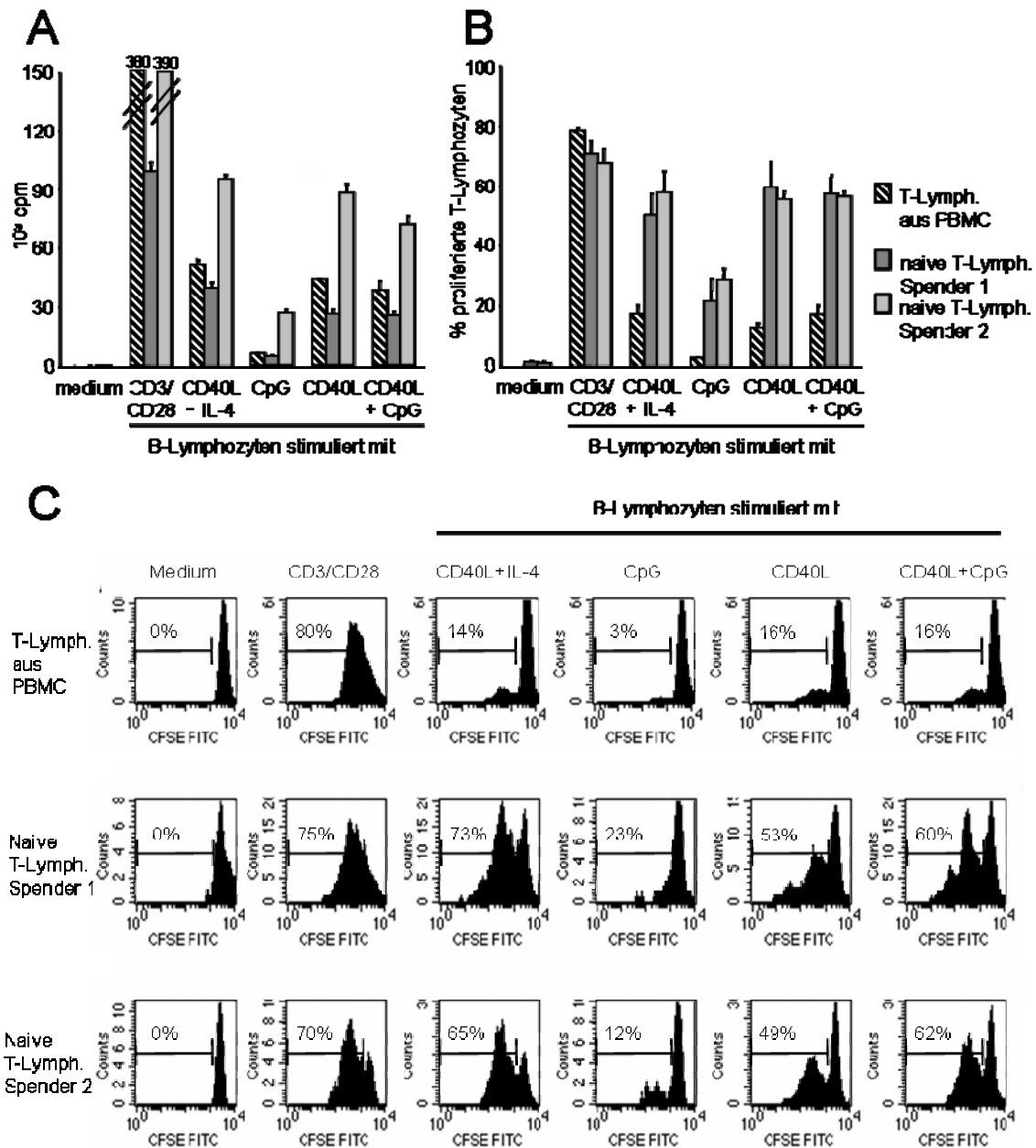
Der oben erläuterte Versuch (Abb. 13) zeigt, dass aktivierte B-Lymphozyten in allogenen T-Lymphozyten Proliferation induzieren. Bei den hierbei verwendeten T-Lymphozyten handelt es sich um eine heterogene Zellpopulation, da sich im peripheren Blut sowohl naive T-Lymphozyten als auch T-Gedächtniszellen finden. Um zu klären, ob tatsächlich naive T-Lymphozyten durch B-Lymphozyten aktiviert werden, wurde das vorherige Experiment mit reinen naiven T-Lymphozyten wiederholt. Um T-Lymphozyten zu gewinnen, die sicher naiv sind, wurde Nabelschnurblut verwendet. T-Lymphozyten aus Nabelschnurblut haben noch kein Antigen gesehen und exprimieren zu 100% das Oberflächenmolekül CD45RA, welches als grober Marker für naive T-Lymphozyten gilt [Sallusto, 2000]. Zusätzlich wurden T-Lymphozyten aus peripherem Blut isoliert, um die Zellteilungsrate beider T-Lymphozytenpopulationen miteinander zu vergleichen.

Sowohl die naiven T-Lymphozyten aus Nabelschnurblut als auch die T-Lymphozyten des peripheren Blutes wurden mit B-Lymphozyten, die vorher mit CpG-ODN, CD40L, der Kombination von CD40L und CpG-ODN oder der Kombination von CD40L und Interleukin-4 inkubiert worden waren, in Kultur gegeben. Zudem wurden in einer Bedingung anti-CD3/ anti-CD28 Mikrobeads in Kombination mit Interleukin-2 und Interleukin-7 zugegeben, um eine maximale Proliferation der naiven T-Lymphozyten zu erreichen. Um eine genauere Vorstellung von der Proliferationsantwort der T-Lymphozyten zu erhalten, wurden zwei verschiedene Methoden zur Messung der Zellteilungsrate angewendet. Der im vorherigen Experiment verwendete [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assay erlaubt eine Aussage über die Proliferation während der letzten 16 Stunden der Kultur, in denen das radioaktiv markierte Thymidin zugegeben wird. Zusätzlich wurde in diesem Experiment der CFSE-Proliferationsassay eingesetzt. Bei diesem werden die T-Lymphozyten zu Beginn der Kultur mit dem Farbstoff CFSE gefärbt, welcher im Durchflusszytometer nachgewiesen werden kann. Teilt sich ein T-Lymphozyt, so wird der Farbstoff an beide Tochterzellen weitergegeben. Diese leuchten dann nur noch mit halber Intensität in der Durchflusszytometrie. Im CFSE-Proliferationsassay lässt sich somit eine Aussage über die Proliferation der T-Lymphozyten während der gesamten Zeitspanne der Kultur treffen.

Abbildung 14A zeigt die Messung der Proliferation der T-Lymphozyten mit Hilfe des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assays. T-Lymphozyten des peripheren Blutes und naive T-Lymphozyten aus der Nabelschnur zeigen beide eine Proliferationsantwort, wenn sie mit B-Lymphozyten inkubiert wurden, die mit CD40L, der Kombination von CD40L und

Interleukin-4 oder der Kombination vom CD40L und CpG-ODN stimuliert wurden. Die alleinige Aktivierung der B-Lymphozyten durch CpG-ODN führte nur zu einer schwachen Proliferation beider T-Lymphozytenpopulationen. CpG-ODN hatte somit nur wenig Einfluss auf die Fähigkeit der B-Lymphozyten Proliferation in T-Lymphozyten zu induzieren. Vielmehr erwies sich die Stimulation mit CD40L als der entscheidende Faktor, welcher B-Lymphozyten zu potenten kostimulatorischen Zellen werden lässt. Der CFSE-Assay zeigte deutlich, dass vor allem die naiven T-Lymphozyten stark durch aktivierte B-Lymphozyten in die Proliferation getrieben werden (Abbildung 14B und 14C). Die Proliferationsrate lag bei den naiven T-Lymphozyten, die mit CD40L-stimulierten B-Lymphozyten inkubiert wurden, im Bereich der Proliferationsrate von T-Lymphozyten, die mit der Kombination von anti-CD3/ anti-CD28 Mikrobeads, Interleukin-2 und Interleukin-7 aktiviert wurden. B-Lymphozyten waren somit ähnlich wie dendritische Zellen in der Lage, naiven T-Lymphozyten als kostimulatorische Zellen zu dienen.

Im [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Assay waren zwischen den beiden Spendern der naiven T-Lymphozyten erhebliche Unterschiede zu beobachten. Die naiven T-Lymphozyten von Spender 1 proliferierten in allen Kulturbedingungen wesentlich schwächer als die von Spender 2. Dagegen war im CFSE-Assay kein Unterschied in der Proliferationsrate der T-Lymphozyten der beiden Spender zu erkennen.

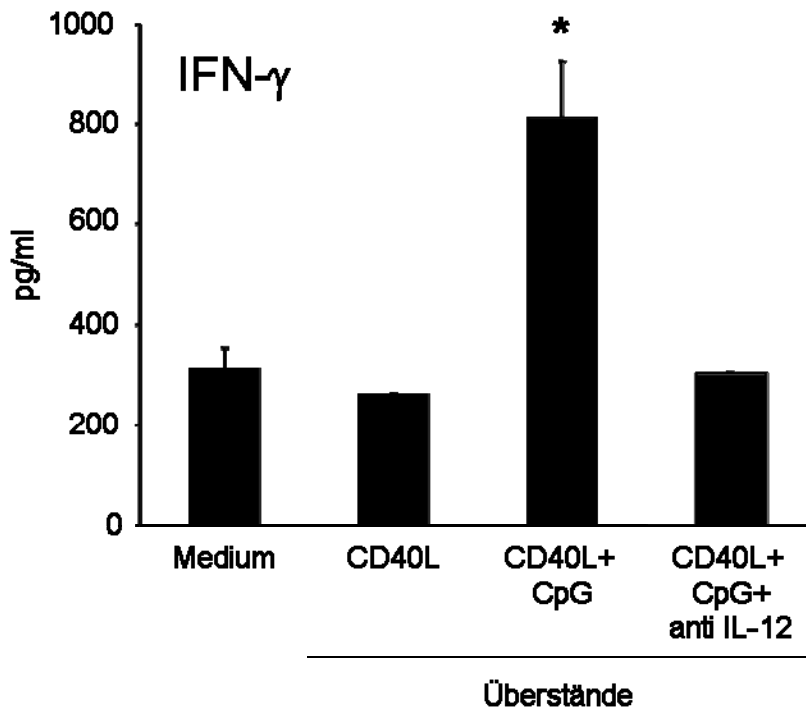


**Abbildung 14: CD40L-aktivierte B-Lymphozyten induzieren Proliferation in allogenen naiven T-Lymphozyten.** Isolierte B-Lymphozyten wurden mit CpG-ODN, CD40L, der Kombinationen von CD40L und Interleukin-4 oder der Kombination von CD40L und CpG-ODN aktiviert. Nach drei Tagen wurden die B-Lymphozyten geerntet, gewaschen und mit 50 Gray bestrahlt. Allogene T-Lymphozyten wurden aus den PBMC von gesunden Erwachsenen und aus Nabelschnurblut gewonnen. Diese aktivierten und bestrahlten B-Lymphozyten wurden mit allogenen T-Lymphozyten für fünf Tage im Verhältnis 1: 3 in Kultur gegeben. Als Postivkontrolle der Proliferation der T-Lymphozyten wurden die T-Lymphozyten mit anti-CD3/ anti-CD28 Microbeads (CD3/ CD28) in Kombination mit Interleukin-2 und Interleukin-7 stimuliert. Jede Bedingung wurde in Triplikaten angesetzt. Die Proliferation der T-Lymphozyten wurde mit Hilfe des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assays (A) und des CFSE-Assays (B) bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert der Triplikate mit dem korrespondierenden SEM angegeben. (C) Gezeigt wird eine repräsentative FACS-Analyse der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Rahmen des CFSE-Assays. Die Prozentangabe entspricht dem Anteil der T-Lymphozyten, die eine verminderte Anfärbung mit CFSE zeigen und sich somit im Laufe der Kokultur mit den B-Lymphozyten mindestens einmal geteilt haben.

#### 3.4.4. Gleichzeitig mit CD40L und CpG-ODN stimulierte B-Lymphozyten verstärken die Produktion von Interferon- $\gamma$ in T-Lymphozyten

Die Sekretion von Zytokinen durch B-Lymphozyten spielt eine wichtige Rolle während der Interaktion eines B-Lymphozyten mit der antigenspezifischen naiven T-Helferzelle. Das Zytokinprofil der antigenpräsentierenden B-Lymphozyten entscheidet in dieser Situation darüber, ob die T-Helferzellen in der späteren Immunantwort T<sub>H</sub>1-Zytokine wie Interferon- $\gamma$  oder T<sub>H</sub>2-Zytokine wie Interleukin-4 und Interleukin-10 bilden [Harris, 2000]. B-Lymphozyten, die gleichzeitig mit CD40L und CpG-ODN aktiviert wurden, zeigen ein deutlich verändertes Zytokinprofil im Vergleich zu B-Lymphozyten, die nur mit CD40L inkubiert wurden. Die Produktion von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- $\alpha$  wurde durch die Anwesenheit von CpG-ODN stark erhöht. Zudem kam es durch die Zugabe von CpG-ODN in B-Lymphozyten, die mit CD40L aktiviert wurden, zur Synthese von Interleukin-12p70.

Im folgenden Versuch wurde die Wirkung der Zytokine, die von B-Lymphozyten sezerniert werden, auf die T-Helferzellen untersucht. Hierzu wurden die Überstände von Kulturen von B-Lymphozyten gesammelt, die für drei Tage entweder nur mit CD40L oder mit der Kombination von CD40L und CpG-ODN inkubiert wurden. CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen wurden aus humanem Spenderblut isoliert. Um mit größtenteils naiven T-Helferzellen zu arbeiten, wurden in einem zweiten Schritt die CD45RA<sup>+</sup> T-Helferzellen isoliert. CD45RA gilt allgemein als Marker naiver T-Lymphozyten, wobei allerdings auch eine kleine Population von aktivierten T-Lymphozyten CD45RA exprimiert [Sallusto, 2000]. Diese CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> T-Lymphozytenpopulation wurde mit dem Überstand aus den B-Lymphozytenkulturen inkubiert. Damit die naiven T-Helferzellen überleben, wurden zusätzlich anti-CD3/ anti-CD28 Mikrobeads zugegeben. Der Überstand der B-Lymphozyten, die nur mit CD40L stimuliert wurden, bewirkte im Vergleich zur Mediumkontrolle keine Erhöhung der Produktion von Interferon- $\gamma$  der T-Helferzellen (Abb. 15). Dagegen verstärkte der Überstand aus B-Lymphozytenkulturen, in denen sowohl CD40L als auch CpG-ODN zugegeben wurde, die Synthese von Interferon- $\gamma$  signifikant. Dieser Effekt ließ sich komplett auslöschen, indem man zur Beginn der Kultur der T-Helferzellen einen Antikörper gegen Interleukin-12p70 zufügte. Diese Ergebnisse belegten, dass die Synthese von Interferon- $\gamma$  von der Anwesenheit von Interleukin-12 abhängig ist. Hierdurch wurde auch ein weiterer Nachweis erbracht, dass B-Lymphozyten nur in Anwesenheit von CD40L und CpG-ODN das biologisch aktive Interleukin-12p70.



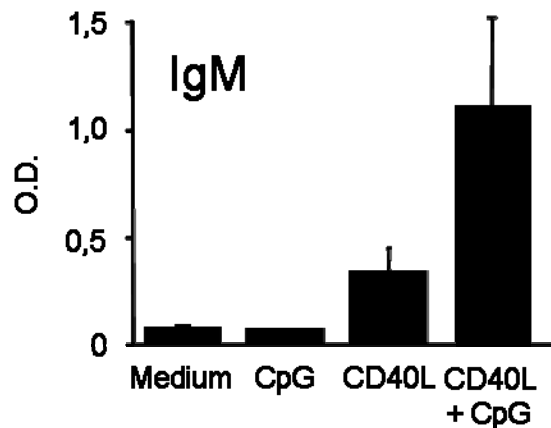
**Abbildung 15:** Der Überstand von Zellkulturen von B-Lymphozyten, die mit der Kombination von CD40L und CpG-ODN stimuliert wurden, verstärkt die Produktion von Interferon- $\gamma$  in aktivierten naiven T-Helferzellen. Naive T-Helferzellen (CD3+, CD4+, CD45RA+) wurden mittels MACS-Technologie aus PBMC isoliert und mit anti-CD3/ anti-CD28 Microbeads stimuliert. Zu Kulturbeginn wurden Überstände aus Zellkulturen von B-Lymphozyten zugegeben, welche entweder mit CD40L oder mit der Kombination von CD40L und CpG-ODN aktiviert wurden. Nach drei Tagen wurde im Überstand der T-Helferzellen Interferon- $\gamma$  mittels ELISA bestimmt. Durch die Verwendung eines Antikörpers gegen Interleukin-12p70 konnte überprüft werden, ob der Effekt der Überstände der B-Lymphozyten durch Interleukin-12p70 vermittelt worden war. Der Antikörper wurde zu Kulturbeginn zugegeben. Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen wurden zu Mittelwerten zusammengefasst und mit dem korrespondierenden SEM dargestellt. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu CD40L oder CD40L + CpG + anti IL-12

### 3.5. Regulation der Plasmazelldifferenzierung durch CpG-Oligonukleotide und CD40 Ligand

Die Entwicklung eines B-Lymphozyten in Richtung Plasmazelle wird entscheidend von T-Helferzellen gesteuert. Eine wichtige Rolle spielt auch hier die Stimulation des B-Lymphozyten über CD40L. Zudem fördern bestimmte Zytokine wie Interleukin-2 die Bildung von Plasmazellen [Liang, 1996]. Da die humorale Immunantwort *in vivo* durch die Gabe von CpG-ODN verstärkt werden kann [Davis, 1998], war es wahrscheinlich, dass auch CpG-ODN *in vitro* die Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen fördert.

Aufgereinigte B-Lymphozyten wurden mit CpG-ODN, CD40L, der Kombination von CpG-ODN und CD40L oder ohne Stimulus für 13 Tage inkubiert. Wurden

B-Lymphozyten mit CD40L aktiviert, so konnte man im Überstand IgM nachweisen (Abb. 16). Diese Immunglobulinproduktion wurde durch zusätzliche Stimulation mit CpG-ODN wesentlich gesteigert.

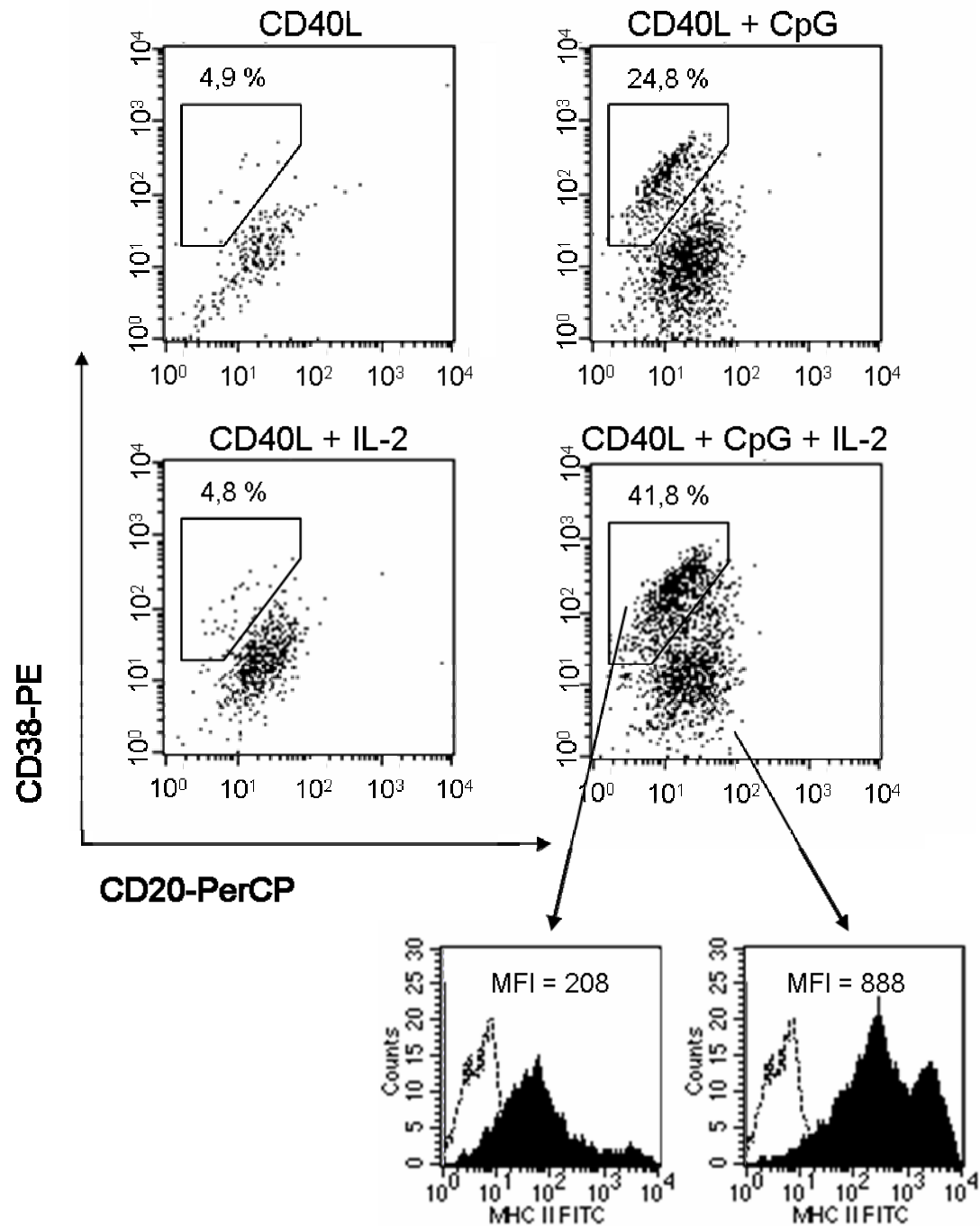


**Abbildung 16: CpG-ODN und CD40L induzieren in B-Lymphozyten synergistisch die Produktion von IgM.** Isolierte B-Lymphozyten wurden mit CpG-ODN, CD40L, der Kombination von CpG-ODN und CD40L oder ohne Stimulus inkubiert. Am 13. Tag wurde IgM anhand der erhöhten optischen Dichte (O. D.) im Überstand mittels ELISA bestimmt. Aus den erhaltenen Daten wurde jeweils der Mittelwert und der SEM berechnet. Gezeigt werden Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

Neben der Immunglobulinproduktion wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die morphologische Veränderung der B-Lymphozyten untersucht. In der Durchflusszytometrie lässt sich die Differenzierung zur Plasmazelle durch die Hochregulation von CD38 bei gleichzeitiger Verminderung der CD20-Expression nachweisen [Jego, 2001]. Ein wichtiger Hinweis für die Entwicklung in Richtung Plasmazelle ist zudem die Abwesenheit von Oberflächenmolekülen wie MHC-Klasse-II, CD80 und CD86, über welche am Anfang der Differenzierung der B-Lymphozyten die Interaktion mit den T-Helferzellen gesteuert wird.

B-Lymphozyten wurden mit CD40L oder mit der Kombination von CD40L und CpG-ODN in An- oder Abwesenheit von Interleukin-2 in Kultur gegeben. Nach 8 Tagen wurde der Prozentsatz an Plasmazellen (CD38+, CD20-) bestimmt. In Abwesenheit von CpG-ODN war die Aktivierung mit CD40L nicht ausreichend, um eine nachweisbare Plasmazellbildung auszulösen (Abb. 17). Wenn jedoch B-Lymphozyten zusammen mit CD40L und CpG-ODN stimuliert wurden, entwickelte sich eine beträchtliche Menge an Plasmazellen. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von Interleukin-2 noch wesentlich verstärkt werden. Die Differenzierung der Plasmazellen wurde zusätzlich über die Messung der Expression von MHC-Klasse-II bestätigt. Die CD38+, CD20- Plasmazellpopulation trug wesentlich weniger MHC-Klasse-II auf ihrer

Oberfläche als die CD38-, CD20+ B-Lymphozyten. CpG-ODN fördert somit die Plasmazelldifferenzierung, welche den letzten Schritt der Differenzierung der B-Lymphozyten darstellt.



**Abbildung 17:** Die gleichzeitige Aktivierung mit CpG-ODN und CD40L führt zur Plasmazelldifferenzierung aufgereinigter B-Lymphozyten. Isolierte B-Lymphozyten wurden mit CD40L und der Kombination von CD40L und CpG-ODN in An- und Abwesenheit von Interleukin-2 inkubiert. Am achten Tag wurde die Expression von CD20, CD38 und MHC-Klasse II mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Gezeigt wird die entsprechende FACS-Analyse.



## 4. Diskussion

### 4.1. Übersicht über die experimentellen Befunde

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) einen starken Stimulus für naive B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen darstellen. Sowohl in naiven B-Lymphozyten als auch in B-Gedächtniszellen wurde TLR9 nachgewiesen, der die notwendige Voraussetzung für die Detektion von CpG-ODN darstellt. Beide Subpopulationen der B-Lymphozyten produzierten nach Aktivierung mit dem CpG-Oligonukleotid ODN 2006 in gleichem Maße Interleukin-6. Im Gegensatz zu CpG-ODN wurde LPS von B-Lymphozyten nicht erkannt.

Weitere Versuche zur Analyse der Zytokinproduktion der B-Lymphozyten ergaben, dass CpG-ODN in humanen B-Lymphozyten neben Interleukin-6 auch die Zytokine Interleukin-10 und TNF- $\alpha$  induziert. Die Synthese dieser Zytokine wurde wesentlich gesteigert, wenn B-Lymphozyten gleichzeitig mit CpG-ODN und CD40L inkubiert wurden. Bei gleichzeitiger Aktivierung mit CpG-ODN und CD40L waren B-Lymphozyten zudem fähig neben den oben genannten Zytokinen das biologisch aktive (p70) Heterodimer des Interleukin-12 (Interleukin-12 p70) zu produzieren. Die optimale Konzentration von CpG-ODN für die Induktion von Interleukin-12p70 in Gegenwart von CD40L lag zwischen 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Auch bakterielle DNA von *Escherichia coli* konnte in Kombination mit CD40L Interleukin-12p70 induzieren. Die Synthese von Interleukin-12 p70 wurde von der Anwesenheit anderer Zytokine beeinflusst. Interleukin-4 inhibierte die Produktion von Interleukin-12p70, wohingegen Interferon- $\gamma$  die Produktion von Interleukin-12p70 leicht verstärkte.

Die Aktivierung mit CD40L und CpG-ODN steigerte in B-Lymphozyten nicht nur die Zytokinsynthese, sondern auch die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Vor allem die Stimulation mit CD40L oder der Kombination von CD40L mit CpG-ODN führte zu hohen Expressionswerten dieser Oberflächemoleküle. CpG-ODN alleine löste dagegen nur eine schwache Bildung von CD80 und CD86 aus.

In Kokulturen von B-Lymphozyten mit allophenen T-Lymphozyten wurde untersucht, ob die B-Lymphozyten den T-Lymphozyten als potente kostimulatorische Zellen dienen können. Wurden B-Lymphozyten mit CD40L oder der Kombination von CD40L und CpG-ODN aktiviert, entwickelten sie sich aufgrund der hohen Expression von CD80 und CD86 zu potenten kostimulatorischen Zellen. Diese lösten in allophenen naiven T-Lymphozyten eine starke Proliferation aus. Dagegen induzierten B-Lymphozyten, die alleine mit CpG-ODN aktiviert wurden und dementsprechend wenige kostimulatorische

Moleküle auf ihrer Zelloberfläche trugen, nur eine geringe Proliferation in allogenen T-Lymphozyten.

Neben dem Einfluss der B-Lymphozyten auf die Proliferation der T-Lymphozyten wurde auch die Wirkung der B-Lymphozyten auf die Produktion von Interferon- $\gamma$  in den T-Lymphozyten untersucht. Hierzu wurden T-Lymphozyten mit dem Überstand von B-Lymphozyten inkubiert. Wurden die B-Lymphozyten mit der Kombination von CD40L und CpG-ODN aktiviert, so führte das im Überstand enthaltene Interleukin-12p70 in den T-Lymphozyten zu einer verstärkten Produktion von Interferon- $\gamma$ . B-Lymphozyten, die nur mit CD40L inkubiert wurden, hatten aufgrund der fehlenden Synthese von Interleukin-12p70 keinen Einfluss auf die Bildung von Interferon- $\gamma$  in den T-Lymphozyten.

Abschließend wurden die Wirkung von CpG-ODN und CD40L auf die Immunglobulinsynthese und die Plasmazelldifferenzierung analysiert. Bei gleichzeitiger Stimulation mit CD40L und CpG-ODN konnte eine starke Produktion von Immunglobulinen nachgewiesen werden. Zudem ließ sich in der Durchflusszytometrie deutlich eine Plasmazellpopulation abgrenzen.

Insgesamt unterstützte CpG-ODN sowohl die immunregulierende Funktion der B-Lymphozyten als auch die Rolle der B-Lymphozyten als Produzenten der Immunglobuline. Nach Aktivierung mit CD40L und CpG-ODN waren die B-Lymphozyten fähig durch die Sekretion von Interleukin-12p70 in T-Lymphozyten die Produktion von Interferon- $\gamma$  zu verstärken und damit eine T<sub>H</sub>1-Differenzierung der Immunantwort auszulösen. Zudem wurde die humorale Immunantwort durch die verstärkte Immunglobulinproduktion in Anwesenheit von CpG-ODN gefördert. Das CpG-Oligonukleotid ODN 2006 stellt daher einen aussichtsreichen Kandidaten im Rahmen von immuntherapeutischen Behandlungsansätzen dar, welche eine T<sub>H</sub>1-Immunantwort induzieren wollen und gleichzeitig auf die Aktivierung der B-Lymphozyten abzielen.

---

## 4.2. Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

### 4.2.1. TLR-Expression in B-Lymphozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von TLR9 und TLR4 in humanen B-Lymphozyten untersucht, den Erkennungsrezeptoren für immunstimulatorische CpG-Oligonukleotide und bakterielles LPS. B-Lymphozyten verfügen jedoch über ein wesentlich breiteres Spektrum an TLRs. Daher wird im Folgenden zunächst eine Übersicht über alle TLRs gegeben, die von B-Lymphozyten exprimiert werden. Anschließend wird detailliert auf die Expression von TLR9 in den Subpopulationen der B-Lymphozyten eingegangen.

Seit der Entdeckung der TLRs, vor allem aber seit der Identifizierung ihrer Liganden, ist es von großem Interesse, welche Kombinationen von TLRs auf den verschiedenen Zellen des humanen Immunsystems exprimiert werden. So hat unsere Arbeitsgruppe die Subpopulationen der humanen PBMCs auf die Expression der TLRs 1 bis 10 hin untersucht [Hornung, 2002]. Als Resultat zeigte sich, dass die B-Lymphozyten TLR1, TLR6, TLR9 und TLR10 stark exprimieren. Im geringeren Maße verfügten sie auch über TLR2, TLR4 und TLR7. TLR3, TLR5 und TLR8 wurde in den B-Lymphozyten nicht nachgewiesen.

In den eigenen Experimenten konnte die starke Expression von TLR9 in den B-Lymphozyten bestätigt werden. TLR4 mRNA war dagegen nur in minimalen Mengen nachweisbar. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Hartmann et al. wurde zudem gezeigt, dass B-Lymphozyten direkt durch das CpG-Oligonukleotid ODN 2006 aktiviert werden [Hartmann, 2000]. Im Gegensatz dazu konnten die B-Lymphozyten nicht durch den TLR4-Agonisten LPS stimuliert werden.

Interessanterweise beobachteten Hornung et al., dass die B-Lymphozyten als einzige Zellpopulation innerhalb der PBMCs hohe Level an TLR10 exprimieren [Hornung, 2002]. Somit ist anzunehmen, dass den B-Lymphozyten eine exklusive Rolle in der Detektion der korrespondierenden PAMPs durch diesen Rezeptor zukommt. Die Identifikation eines Liganden für TLR10 würde daher die interessante Möglichkeit eröffnen in PBMCs selektiv B-Lymphozyten zu aktivieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von TLR9 innerhalb der Subpopulationen der B-Lymphozyten analysiert. Es wurde der Beweis erbracht, dass sowohl naive B-Lymphozyten als auch B-Gedächtniszellen über TLR9 verfügen und direkt über CpG-ODN aktiviert werden. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit

den Ergebnissen von Bourke et al. für B-Lymphozyten, die aus Tonsillen isoliert wurden [Bourke, 2003]. Sie konnten ebenfalls in naiven B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen TLR9 mRNA nachweisen. Weiterführend wurden von ihnen festgestellt, dass auch die B-Lymphozyten des Keimzentrums TLR9 exprimieren.

Auch die Studie von Bernasconi et al. konzentrierte sich auf die Expression von TLR9 innerhalb der Subpopulationen der humanen B-Lymphozyten [Bernasconi, 2003]. Als Resultat zeigte sich, dass sich in den naiven B-Lymphozyten eine fünffach niedrigere Kopienzahl von TLR9 als in B-Gedächtniszellen findet. Im Vergleich dazu wurde in der vorliegenden Arbeit in naiven B-Lymphozyten etwa die Hälfte der TLR9 mRNA nachgewiesen wie in B-Gedächtniszellen. Aufgrund des niedrigen Levels an TLR9 mRNA waren laut Bernasconi naive B-Lymphozyten unfähig CpG-ODN zu erkennen. Diese Hypothese wurde dadurch gestützt, dass naive B-Lymphozyten nach Stimulation mit CpG-ODN keine Immunglobuline sezernierten. Die Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zur vorliegenden Arbeit, da in den eigenen Versuchen die naiven B-Lymphozyten trotz ihrer geringeren TLR9-Expression in der Lage waren, CpG-ODN zu erkennen und in Anwesenheit von CpG-ODN Interleukin-6 auszuschütten.

Beim Vergleich dieser vordergründig widersprüchlichen Beobachtungen ist zu beachten, dass die Arbeitsgruppe von Bernasconi die Immunglobulinsynthese als Marker für die Erkennung von CpG-ODN auswählte. Im Gegensatz dazu wurde in den eigenen Versuchen die Produktion von Interleukin-6 bestimmt, um herauszufinden, ob B-Lymphozyten auf CpG-ODN reagieren. Es ist durchaus möglich, dass Interleukin-6 der sensitivere Marker für die Aktivierung der B-Lymphozyten ist, da die Induktion der Immunglobulinsynthese in B-Lymphozyten meist zusätzliche Faktoren wie die Stimulation über den Antigenrezeptor, die Interaktion mit CD40L oder die Anwesenheit größerer Mengen an Zytokine benötigt [Banchereau, 1994]. Dementsprechend sollte eine fehlende Immunglobulinproduktion in naiven B-Lymphozyten nicht automatisch mit einer Unfähigkeit dieser Zellen gleichgesetzt werden, CpG-ODN zu erkennen.

Übereinstimmend zeigen alle Studien, dass B-Gedächtniszellen und B-Lymphozyten aus dem Keimzentrum TLR9 exprimieren und CpG-ODN erkennen [Peng, 2005]. Ob auch, wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt, naive B-Lymphozyten durch CpG-ODN direkt aktiviert werden, ist noch Gegenstand der aktuellen Diskussion.

#### 4.2.2. CpG-Oligonukleotide induzieren eine starke Zytokinproduktion in B-Lymphozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zytokinsynthese in B-Lymphozyten in Anwesenheit von CpG-ODN und CD40L untersucht. Als überraschendes Ergebnis zeigte sich hierbei, dass B-Lymphozyten in der Lage sind Interleukin-12 zu bilden. Das biologisch aktive Interleukin-12p70 konnte jedoch nur detektiert werden, wenn B-Lymphozyten sowohl mit CpG-ODN als auch über CD40L stimuliert wurden. In der Tabelle 2 sind die eigenen Ergebnisse bezüglich der Zytokinproduktion der B-Lymphozyten nach Aktivierung mit CpG-ODN und CD40L zusammengefasst.

Stimulation der B-Lymphozyten mit

	CpG-ODN	CD40L	CpG-ODN + CD40L
TNF- $\alpha$	+	+	++
Interleukin-6	+	+	+++
Interleukin-10	+	+	+++
Interleukin-12p40	-	+	+++
Interleukin-12p70	-	-	++

**Tabelle 2: Regulation der Zytokinsynthese in B-Lymphozyten durch CpG-ODN und CD40L**

Schon die Arbeit von Krieg et al., in der zum ersten Mal die immunstimulatorische Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf murine B-Lymphozyten beobachtet wurde, beschreibt die Synthese von Interleukin-6 nach Aktivierung mit CpG-Oligonukleotiden [Krieg, 1995]. Eine weitergehende Analyse der durch CpG-ODN induzierten Zytokinproduktion ergab, dass murine B-Lymphozyten neben Interleukin-6 auch Interleukin-10 bilden [Redford, 1998]. Die Produktion dieser beiden Zytokine in Gegenwart von CpG-Oligonukleotid ODN 2006 wurde von Hartmann et al. für humane B-Lymphozyten bestätigt [Hartmann, 2000]. Bohle et al. konnte zudem nachweisen, dass humane B-Lymphozyten nach Kontakt mit CpG-ODN TNF- $\alpha$  ausschütten [Bohle, 2001]. Im Einklang mit den genannten Studien wurde in der vorliegenden Arbeit in aufgereinigten humanen B-Lymphozyten die Produktion von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- $\alpha$  nach Stimulation mit CpG-ODN beobachtet.

Murine B-Lymphozyten reagieren entsprechend der Arbeit von Shirota et al. bereits bei alleiniger Aktivierung durch CpG-ODN mit der Bildung von Interleukin-12 [Shirota, 2002]. Überraschenderweise war CpG-ODN alleine nicht in der Lage, die Produktion von Interleukin-12 in humanen B-Lymphozyten hervorzurufen. Erst die Kombination von CD40L und CpG-ODN führte in den eigenen Versuchen zur Induktion von Interleukin-12.

Wurden die B-Lymphozyten sowohl über CpG-ODN als auch durch CD40L aktiviert, kam es zur verstärkten Synthese von Interleukin-6, Interleukin-10, TNF- $\alpha$  und zur Bildung von Interleukin-12. Den Synergismus von CD40L und CpG-ODN haben auch Gantner et. al beschrieben [Gantner, 2003]. Sie bestimmten die Zytokine Interleukin-10 und Interleukin-6 und zeigten, dass die Kombination von CD40L und CpG-ODN zu einem starken Anstieg der Zytokine führt. Die vermehrte Zytokinsynthese war in ihren Versuchen ein wichtiger autokriner Stimulator für die Immunglobulinsynthese. Auch Decker et al. konnten den synergistischen Effekt von CD40L und CpG-ODN auf die Bildung von Interleukin-6 und TNF-  $\alpha$  in B-Lymphozyten nachweisen [Decker, 2000].

In der Vergangenheit wurde bei Studien an B-Lymphozyten die Beobachtung gemacht, dass sie unter bestimmten Bedingungen fähig sind Interleukin-4 zu bilden [Bastien, 1999; Harris, 2000; Johansson-Lindbom, 2002; Ohnishi, 1997]. Die Synthese von Interleukin-4 war in isolierten B-Lymphozyten über die Stimulation mit dem *platelet-activating factor* (PAF) induzierbar [Bastien, 1999]. Zudem ließ sich Interleukin-4 in Epstein-Barr-Virus infizierten B-Lymphozyten von Atopikern nachweisen [Ohnishi, 1997]. Im Mausmodell konnten Interleukin-4-produzierende B-Lymphozyten nach Infektion mit Erregern, welche eine stark  $T_H2$ -gewichtete Immunantwort auslösen, isoliert werden [Harris, 2000]. In der vorliegenden Arbeit war die Synthese von Interleukin-4 durch aufgereinigte humane B-Lymphozyten in keiner Versuchsbedingung nachweisbar. Ebenso konnte keine Produktion von Interferon- $\gamma$  in B-Lymphozyten induziert werden, wie sie von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde [Durali, 2003; Flaishon, 2000; Harris, 2000; Yoshimoto, 1997]. In den Versuchen von Durali et al. und Yoshimoto et al. benötigten B-Lymphozyten zur Bildung von Interferon- $\gamma$  die Zugabe von Interleukin-12 und Interleukin-18 [Durali, 2003; Yoshimoto, 1997]. *In vivo* wurde die Interferon- $\gamma$ -Bildung durch B-Lymphozyten im Mausmodell nach Infektion mit dem intrazellulären Erreger *Toxoplasma gondii* nachgewiesen [Harris, 2000].

#### 4.2.3. B-Lymphozyten benötigen für die Produktion von Interleukin-12p70 die Anwesenheit von CpG-Oligonukleotiden und CD40 Ligand

Wie bei den eigenen Versuchen gezeigt, produzieren B-Lymphozyten nur Interleukin-12p70, wenn sie sowohl mit CpG-ODN als auch über CD40L aktiviert wurden. Es bestand nun die Frage, ob eine Stimulation über den Antigenrezeptor ebenfalls in Kombination mit CpG-ODN zur Bildung von Interleukin-12 führt, oder ob die Synthese von Interleukin-12 streng von der Anwesenheit von CD40L abhängig ist.

Dass die Quervernetzung des Antigenrezeptors die Zytokininduktion in Anwesenheit von CpG-ODN verbessert, wurde von Poeck et al. für die Zytokine Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- $\alpha$  belegt [Poeck, 2004]. In der vorliegenden Arbeit führte die Quervernetzung der Antigenrezeptoren in Kombination mit CpG-ODN ebenfalls zur synergistischen Steigerung der Synthese von Interleukin-6. Eine Induktion von Interleukin-12p70 konnte jedoch durch die Kombination von CpG-ODN mit der Quervernetzung der Antigenrezeptoren nicht induziert werden. Zur Bildung von Interleukin-12p70 kam es in humanen B-Lymphozyten nur, wenn die B-Lymphozyten gleichzeitig über CD40L und CpG-ODN stimuliert wurden.

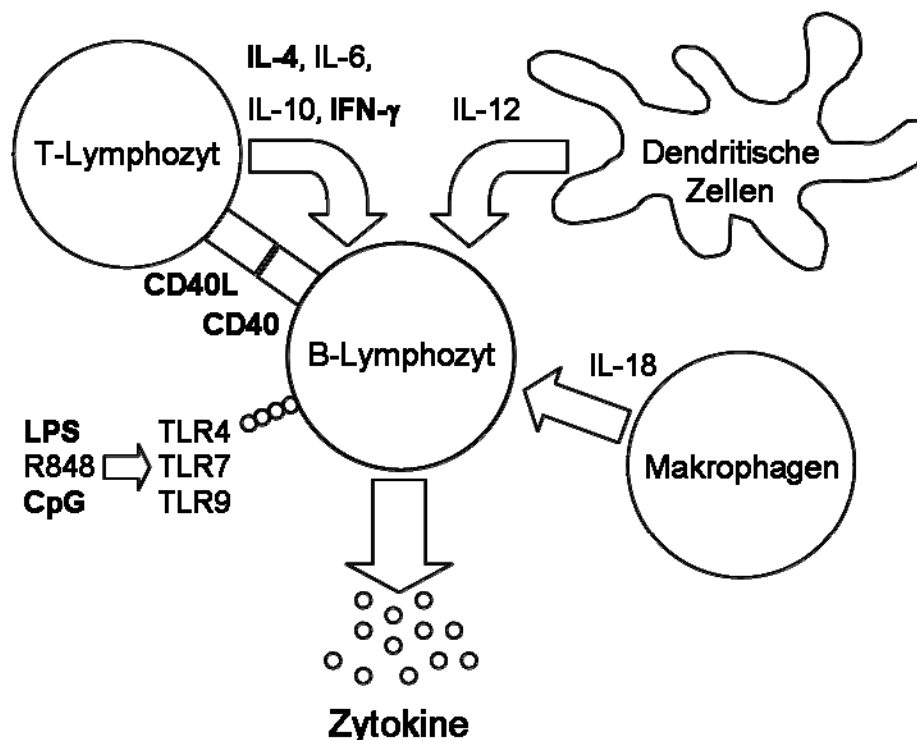
Die Beobachtung, dass CD40L alleine kein Interleukin-12p70 in B-Lymphozyten induziert, steht im Widerspruch zu Ergebnissen von Schultze et al. [Schultze, 1999]. Die alleinige Aktivierung mit CD40L war in ihrer Arbeit ausreichend, um in humanen B-Lymphozyten aus Tonsillen die Synthese von Interleukin-12 hervorzurufen. Möglicherweise sind diese konträren Ergebnisse durch die unterschiedlichen Isolations- und Kulturmethoden bedingt, da sonst vergleichbare Versuchsbedingungen zur Anwendung kamen. Eine weiter denkbare Erklärung wäre, dass sich die B-Lymphozyten des peripheren Blutes auf einer anderen Aktivierungsstufe als die B-Lymphozyten aus den lymphatischen Geweben befinden. Zudem könnten die B-Lymphozyten aus den Tonsillen während der operativen Entfernung durchaus mit mikrobiellen Substanzen aus der Mundhöhle in Kontakt gekommen sein und dadurch eine Vorstimulation erfahren haben.

#### 4.2.4. Steuerung der Zytokinproduktion in B-Lymphozyten

Die vorliegende Arbeit belegt, dass CpG-ODN ein wichtiger Regulationsfaktor für die Zytokinproduktion der B-Lymphozyten ist. Der folgende Abschnitt wird einen Überblick über die Studien geben, die die Steuerung der Zytokinproduktion in B-Lymphozyten

untersuchten. Anhand dieser Übersicht lassen sich die eigenen Ergebnisse in den Kontext der aktuellen Forschung einordnen.

Es lassen sich grob folgende Faktoren definieren, welche die Zytokinsynthese in B-Lymphozyten beeinflussen: die Art des Antigens, die Anwesenheit von mikrobiellen Bestandteilen, die Interaktion mit T-Lymphozyten und die Interaktion mit dendritischen Zellen und Makrophagen. Die Abbildung 18 stellt die bisher untersuchten Einflussfaktoren auf die Zytokinproduktion der B-Lymphozyten graphisch dar.



**Abbildung 18: Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit bekannte Einflussfaktoren auf die Zytokinsynthese der B-Lymphozyten.** Die fett gedruckten Einflussfaktoren wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Hierbei handelt es sich um 1. die Wirkung von CD40L auf die Zytokinproduktion; 2. die Wirkung des TLR4-Liganden LPS und des TLR9-Liganden CpG-ODN auf die Zytokinproduktion; 3. den Einfluss des umgebenden Zytokinmilieus (Interleukin-4 und Interferon- $\gamma$ ) auf die Zytokinproduktion.

#### 4.2.4.1. Regulation durch T-Lymphozyten

Die Arbeitsgruppe um Harris veröffentlichte die erste Studie, die zeigen konnte, dass sich B-Lymphozyten entsprechend ihrem Zytokinprofil in Be1-Zellen (bilden Interferon- $\gamma$  und Interleukin-12) und Be2-Zellen (bilden Interleukin-4 und Interleukin-10) einteilen lassen [Harris, 2000]. Sie konnten nachweisen, dass das Zytokinprofil der B-Lymphozyten durch die Differenzierung der T-Lymphozyten festgelegt wird, mit denen die B-Lymphozyten interagieren. Interferon- $\gamma$ -produzierende T-Lymphozyten



(T<sub>H</sub>1-Zellen) induzierten in den B-Lymphozyten die Differenzierung zu Be1-Zellen, während T-Lymphozyten, die Interleukin-4 und Interleukin-10 bildeten (T<sub>H</sub>2-Zellen), die Entwicklung von Be2-Zellen hervorriefen.

Durch welche Signale die T-Lymphozyten die Entwicklung der B-Lymphozyten in Richtung Be1-Zellen und Be2-Zellen beeinflussen, wird noch nicht vollständig verstanden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich die B-Lymphozyten entsprechend dem von den T-Lymphozyten gebildetem Zytokinmilieu ausdifferenzieren.

Die Arbeit von Schultze et al. liefert einen wichtigen Beleg für diese Hypothese. Es konnte gezeigt werden, dass das T<sub>H</sub>1-Zytokin Interferon- $\gamma$  die Produktion von Interleukin-12 in B-Lymphozyten fördert. Im Gegensatz dazu inhibierten die T<sub>H</sub>2-Zytokine Interleukin-4 und Interleukin-10 die Synthese von Interleukin-12 [Schultze, 1999]. Die vorliegende Arbeit unterstützt ebenfalls diese Hypothese, da das T<sub>H</sub>2-Zytokin Interleukin-4 die Produktion von Interleukin-12 in den B-Lymphozyten inhibierte, wohingegen das T<sub>H</sub>1-Zytokin Interferon- $\gamma$  die Synthese von Interleukin-12 unterstützte.

Denkbar ist zudem eine Steuerung der Entwicklung der B-Lymphozyten über die Expression von Oberflächenmolekülen auf den T-Lymphozyten. Es zeigte sich, dass B-Lymphozyten erst nach Interaktion mit den T-Lymphozyten über den CD40L in der Lage waren, Interleukin-4, Interleukin-12 und Interferon- $\gamma$  zu bilden [Lund, 2005]. Hierbei war besonders die Synthese von Interleukin-12 von der Stimulation durch den CD40L abhängig [Schultze, 1999]. Entsprechend der Arbeit von Lee et al. tragen T<sub>H</sub>1-Zellen mehr CD40L-Moleküle für eine längere Zeit auf ihrer Oberfläche als T<sub>H</sub>2-Zellen [Lee, 2002]. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass nur die T<sub>H</sub>1-Zellen aufgrund der starken CD40L-Expression in der Lage sind, die Differenzierung der B-Lymphozyten in Richtung Interleukin-12-produzierende Be1-Zellen zu fördern.

Die eigenen Ergebnisse bestätigen die Beobachtung, dass humane B-Lymphozyten zur Produktion von Interleukin-12 auf die Anwesenheit von CD40L angewiesen sind. Es wird jedoch gezeigt, dass B-Lymphozyten einen zusätzlichen mikrobiellen Stimulus wie CpG-ODN benötigen, um signifikante Mengen an biologisch aktiven Interleukin-12p70 zu exprimieren.

#### *4.2.4.2. Regulation durch Liganden der Toll-like-Rezeptoren*

Die B-Lymphozyten sind mit einer Reihe von TLRs ausgestattet. Bisher wurde der Einfluss von LPS (Ligand von TLR4), R848 (Ligand von TLR7) und CpG-ODN (Ligand von TLR9) auf die Zytokinsynthese der B-Lymphozyten untersucht.

Murine B-Lymphozyten exprimieren in Anwesenheit von LPS Interleukin-6 und Interleukin-10 [Lund, 2005]. Ebenso induziert R848 [Bekeredjian-Ding, 2005; Bishop, 2000; Tomai, 2000] und CpG-ODN [Bohle, 2001; Poeck, 2004] in B-Lymphozyten Zytokine wie Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- $\alpha$ . Bisher wurde zudem publiziert, dass die Stimulation mit CpG-ODN in murinen B-Lymphozyten zur Synthese von Interleukin-12 führt [Shirota, 2002]. Insgesamt steht die Untersuchung der Wirkung der TLR-Liganden auf die Zytokinproduktion in B-Lymphozyten jedoch noch am Anfang. Inwieweit TLR-Liganden Einfluss auf die Entscheidung haben, ob sich B-Lymphozyten in Richtung von Be1-Zellen oder Be2-Zellen entwickeln, ist noch nicht abschließend geklärt.

Die eigenen Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass CpG-ODN die Differenzierung von Be1-Zellen fördert, da in den vorgestellten Versuchen erst die Anwesenheit von CpG-ODN die Synthese des T<sub>H</sub>1-Zytokins Interleukin-12p70 in den B-Lymphozyten ermöglichte.

#### *4.2.4.3. Regulation durch dendritischen Zellen und Makrophagen*

Der Einfluss von dendritischen Zellen und Makrophagen auf die Zytokinproduktion in B-Lymphozyten wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Der Vollständigkeit halber werden die aktuellen Studien auf diesem Gebiet kurz vorgestellt

Wie oben beschrieben wurde, spielt das Zytokinmilieu, in welchem sich die B-Lymphozyten befinden, eine wichtige Rolle bei der Entscheidung, welche Art von Zytokinen die B-Lymphozyten produzieren. Naive B-Lymphozyten exprimieren einige Rezeptoren für Zytokine, die von dendritischen Zellen gebildet werden. Dementsprechend wurde vermutet, dass dendritische Zellen die Entwicklung und Differenzierung von B-Lymphozyten beeinflussen können [Banchereau, 2000]. Die Arbeitsgruppe um Caux zeigte, dass dendritische Zellen direkt das Wachstum und die Differenzierung von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten verstärken und dass dieser Effekt über lösliche Faktoren vermittelt wird [Dubois, 1998; Dubois, 1997; Fayette, 1998]. Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei einem der Faktoren um Interleukin-12 handelt [Dubois, 1998]. Interleukin-12 förderte nicht nur das Wachstum der

B-Lymphozyten, sondern auch die Entwicklung der B-Lymphozyten in Richtung Be1-Zellen, die Interferon- $\gamma$  bildeten [Airoidi, 2002; Durali, 2003; Yoshimoto, 1997].

Nach Stimulation mit Interleukin-12 exprimierten B-Lymphozyten zudem verstärkt den Interleukin-18-Rezeptor und sprachen auf Stimulation mit Interleukin-18 an, einem Zytokin, welches von aktivierten Makrophagen gebildet wird [Okamura, 1998]. Die Arbeitsgruppe um Nakanishi konnte nachweisen, dass B-Lymphozyten in Anwesenheit von Interleukin-12 und Interleukin-18 geringe Mengen von Interferon- $\gamma$  sezernieren. Diese Produktion von Interferon- $\gamma$  wird wesentlich gesteigert, wenn die B-Lymphozyten zusätzlich über CD40L aktiviert wurden [Yoshimoto, 1997].

Entsprechend den oben genannten Studien fördern die Zytokine Interleukin-12 und Interleukin-18, welche von dendritischen Zellen und Makrophagen gebildet werden, die Produktion von Interferon- $\gamma$  in B-Lymphozyten. Da in der vorliegenden Arbeit die B-Lymphozyten weder mit Interleukin-12 noch mit Interleukin-18 stimuliert wurden, konnte keine Produktion von Interferon- $\gamma$  detektiert werden.

#### 4.2.5. Der Einfluss der CpG-Oligonukleotiden auf die kostimulatorische Fähigkeit der B-Lymphozyten

In der vorliegenden Arbeit exprimierten die B-Lymphozyten nach Aktivierung über CD40L eine große Menge der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und dienten naiven allo-genen T-Lymphozyten als potente kostimulatorische Zellen. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse anderen Studien, die ebenfalls CD40L als Stimulator für B-Lymphozyten verwendeten [Lapointe, 2003; Schultze, 1997]. Auch B-Lymphozyten, die mit der Kombination von CD40L und CpG-ODN inkubiert wurden, waren in der vorliegenden Arbeit potente kostimulatorische Zellen. CpG-ODN alleine hatte überraschenderweise nur einen relativ geringen Einfluss auf die Expression von CD80 und CD86 und damit auf die kostimulatorische Fähigkeit der B-Lymphozyten.

Es wurde mehrfach berichtet, dass humanen B-Lymphozyten und viele von B-Lymphozyten abgeleitete Non-Hodgkin-Lymphome auf CpG-ODN mit einer Hochregulation ihrer kostimulatorischen Moleküle reagieren [Hartmann, 2000; Jahrsdorfer, 2001; Jahrsdorfer, 2005]. Decker et al. untersuchten den Effekt der vermehrten Expression der kostimulatorischen Moleküle auf die Proliferation von allo-genen T-Lymphozyten in einer MLR [Decker, 2000]. Die malignen B-Lymphozyten, die mit CpG-ODN aktiviert wurden, induzierten eine starke Proliferation in allo-genen T-Lymphozyten. Dieser Effekt wurde komplett inhibiert, wenn

in das Kultursystem blockierende Antikörper gegen CD80 und CD86 zugegeben wurden. Auch für normale murine B-Lymphozyten konnte bereits nachgewiesen werden, dass die durch CpG-ODN induzierte Expression von kostimulatorischen Molekülen eine starke Proliferation von antigenspezifischen T-Lymphozyten hervorruft [Shirota, 2002]. Entsprechend den eigenen Ergebnissen erscheint jedoch die Stimulation über CD40L der wesentliche Faktor zu sein, um aus B-Lymphozyten potente antigenpräsentierende Zellen zu generieren.

#### 4.2.6. Die immunregulatorische Funktion der B-Lymphozyten

Neueste Versuche an Mäusen haben gezeigt, dass B-Lymphozyten im Rahmen von Autoimmunerkrankungen und Infektionen die Immunreaktion sowohl verstärken als auch abschwächen können. Hierbei war die Wirkung der B-Lymphozyten auf die Immunantwort unabhängig von der Antikörperproduktion. Vielmehr beeinflussten die B-Lymphozyten die Immunreaktion, indem sie Zytokine ausschütteten und T-Lymphozyten Antigene präsentierten [Lund, 2005; Pistoia, 1997]. Die vorliegende Arbeit liefert *in vitro*-Daten, die zeigen, dass B-Lymphozyten über die Produktion von Interleukin-12 eine  $T_H1$ -Immunantwort fördern. Ob B-Lymphozyten allerdings *in vivo* eher eine  $T_H1$ - oder eine  $T_H2$ -Immunantwort unterstützen, ist noch nicht geklärt.

##### 4.2.6.1. Unterdrückung einer $T_H1$ -Immunantwort durch B-Lymphozyten

Wurden die B-Lymphozyten in den eigenen Versuchen mit CpG-ODN und CD40L stimuliert, sezernierten sie relativ große Mengen an Interleukin-10. In aktuellen Arbeiten auf dem Gebiet der Autoimmunerkrankungen wird eine durch Interleukin-10 vermittelte  $T_H1$ -antagonistische Funktion der B-Lymphozyten postuliert. Die Injektion von Interleukin-10 sezernierenden B-Lymphozyten (Be2-Zellen) brachte in Mäusen mit rheumatoider Arthritis und multipler Sklerose die Erkrankung zur Ausheilung [Fillatreau, 2002; Mauri, 2003]. Beide Autoimmunerkrankungen sind durch eine starke  $T_H1$ -Immunantwort gegen körpereigene Antigene gekennzeichnet. B-Lymphozyten entfalteten in diesen Tiermodellen ihre immunregulatorische Wirkung über die Produktion von Interleukin-10, welches die Synthese von Interferon- $\gamma$  in den autoreaktiven T-Lymphozyten inhibierte. Der verminderte Spiegel an Interferon- $\gamma$  korrelierte wiederum sehr gut mit der Ausheilung der Autoimmunerkrankung. Eine wichtige immunregulatorische Funktion der B-Lymphozyten wurde ebenfalls in einem Mausmodell für chronisch entzündliche Darmerkrankung angenommen. Das von

B-Lymphozyten gebildete Interleukin-10 unterband auch hier den entzündlichen Prozess durch die Hemmung der Produktion von  $T_H1$ -Zytokinen [Mizoguchi, 2002].

Die Arbeitsgruppe um Krieg konnte nachweisen, dass B-Lymphozyten durch die Synthese von Interleukin-10 die durch CpG-ODN hervorgerufene Produktion von  $T_H1$ -Zytokinen wie Interleukin-12 und Interferon- $\gamma$  hemmen [Redford, 1998]. Wurde die Bildung von Interleukin-10 in den B-Lymphozyten durch Cyclosporin A inhibiert, war wesentlich mehr Interleukin-12 und Interferon- $\gamma$  im Überstand nachweisbar. Eine mögliche Erklärung, wie B-Lymphozyten über Interleukin-10 eine  $T_H1$ -Immunantwort inhibieren, lieferte die Arbeit von Sun et al. [Sun, 2005]. CD5+ B-Lymphozyten bildeten nach Gabe von CpG-ODN Interleukin-10 und hemmten hierdurch die Synthese von Interleukin-12 in den dendritischen Zellen. Der Mangel an Interleukin-12 führte wiederum zur verminderten Produktion von Interferon- $\gamma$  in den T-Lymphozyten.

#### 4.2.6.2. Verstärkung einer $T_H1$ -Immunantwort durch B-Lymphozyten

Es gibt jedoch auch Anhaltspunkte, die auf eine Verstärkung von  $T_H1$ -Immunreaktionen durch B-Lymphozyten hinweisen. Im Mausmodell konnten Harris et al. nachweisen, dass sich bei Infektionen mit *Toxoplasma gondii* in großer Zahl B-Lymphozyten finden, die  $T_H1$ -Zytokine bilden (Be1-Zellen). Die Immunreaktion auf *Toxoplasma gondii* ist durch eine  $T_H1$ -gewichtete Immunantwort gekennzeichnet. Dementsprechend scheinen Be1-Zellen das vorherrschende  $T_H1$ -Zytokinmilieu zu stabilisieren [Harris, 2000]. Dass auch beim Menschen B-Lymphozyten ursächlich an durch T-Lymphozyten vermittelten Immunreaktionen verantwortlich sein können, wird von einer aktuellen Studie postuliert, in der mit Hilfe von DNA-Mikroarrays neue Prognosekriterien für die akute Abstoßungsreaktion bei Nierentransplantationen entwickelt wurden [Sarwal, 2003]. Befanden sich in dem Transplantat dichte Infiltrate von B-Lymphozyten, kam es zur Abstoßung der Niere, die nicht mit Glukokortikoiden beherrschbar war. Die B-Lymphozyten bildeten weder Follikel noch trugen sie durch die Produktion von Immunglobulinen zur Immunreaktion bei. Sarwal et al. vermuten, dass sie autoreaktiven T-Lymphozyten als antigenpräsentierende Zellen dienen und durch die Produktion von Zytokinen deren Zytotoxizität steigern.

Bisher wurde hauptsächlich aus *in vitro*-Versuchen ein  $T_H1$ -Effekt der B-Lymphozyten abgeleitet. In der Studie von Harris et al. wurde eingehend die Wirkung von B-Lymphozyten auf das Zytokinprofil der T-Lymphozyten untersucht [Harris, 2000]. Hierzu wurden Be1-Zellen mit naiven T-Lymphozyten in Kultur gegeben. Erstaunlicherweise übertrugen die B-Lymphozyten ihr Zytokinprofil auf die

T-Lymphozyten. Wurden T-Lymphozyten dementsprechend mit Be1-Zellen kultiviert, entwickelten sie sich zu Interferon- $\gamma$ -produzierenden  $T_H1$ -Zellen. Die Differenzierung der T-Lymphozyten in  $T_H1$ -Zellen wurde in der Arbeit von Harris et al. durch die Zytokine Interleukin-12 und Interferon- $\gamma$  induziert, welche von den B-Lymphozyten sezerniert wurden [Harris, 2000].

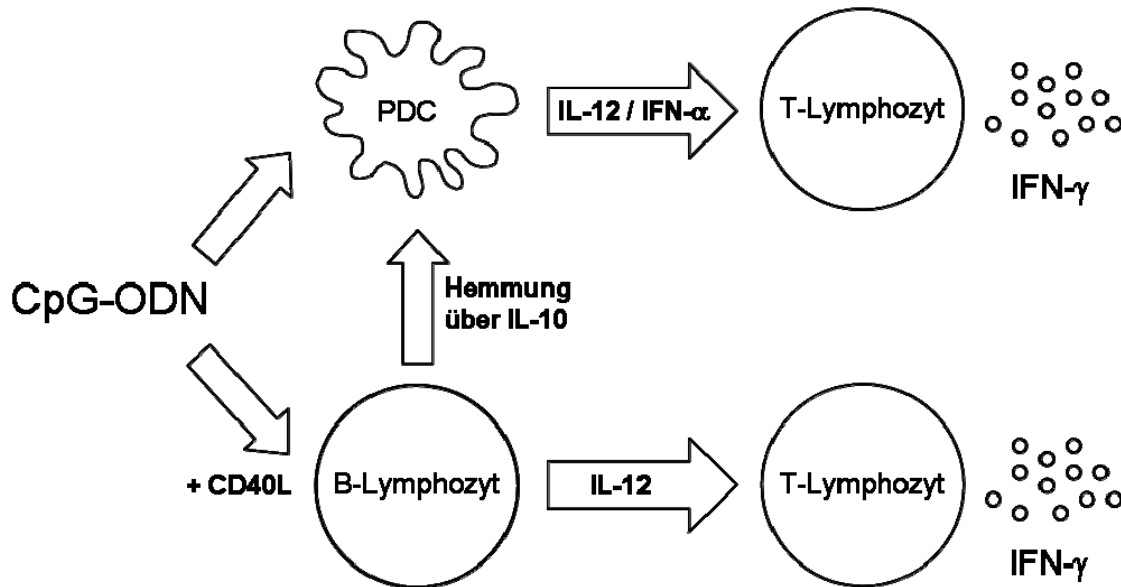
In der vorliegenden Arbeit wurde in B-Lymphozyten nach Aktivierung mit CD40L und CpG-ODN das  $T_H1$ -Zytokin Interleukin-12 nachgewiesen, welches die Produktion von Interferon- $\gamma$  in T-Lymphozyten steigerte. Bei Shirota et al. und Schultze et al. wird der von B-Lymphozyten ausgehende  $T_H1$ -Effekt ebenfalls durch die Synthese von Interleukin-12 erklärt [Schultze, 1999; Shirota, 2002]. Dagegen führte Bohle et al. ein abgeschwächtes  $T_H2$ -Zytokinmilieu in PBMCs von Atopikern nach Kultivierung mit CpG-ODN auf eine vermehrte Sekretion von TNF- $\alpha$  zurück, welches ausschließlich von B-Lymphozyten gebildet wurde [Bohle, 2001]. Von Reid et al. wurde beobachtet, dass maligne prä-B-Lymphozyten nach Aktivierung mit CpG-ODN in allogenen T-Lymphozyten eine vermehrte Bildung von Interferon- $\gamma$  induzierten, ohne dass diese B-Lymphozyten eine messbare Menge an Interleukin-12 oder TNF- $\alpha$  sezernierten [Reid, 2005]. Möglicherweise wird der  $T_H1$ -Effekt von B-Lymphozyten somit durch weiter noch unbekannte Faktoren vermittelt.

#### *4.2.6.3. Welchen Effekt haben B-Lymphozyten nach Kontakt mit CpG-ODN auf die Immunantwort der T-Lymphozyten?*

Gesichert ist, dass die Gabe von CpG-ODN in der Maus *in vivo* eine  $T_H1$ -Immunantwort auslöst [Davila, 2000; Vabulas, 2000; Verthelyi, 2002]. Es besteht nun die Frage, ob die B-Lymphozyten zur Verstärkung der  $T_H1$ -Polarisierung beitragen oder ob sie diese über die Produktion von Interleukin-10 hemmen?

Die Abbildung 19 stellt sehr vereinfacht die Induktion von  $T_H1$ -Zellen durch die Anwesenheit von CpG-ODN dar. Nach Gabe von CpG-ODN kommen nur die PDCs und die B-Lymphozyten als Initiatoren der Immunantwort in Frage, da nur sie über TLR9 verfügen. Die PDCs bilden nach Kontakt mit CpG-ODN Interferon- $\alpha$  oder Interleukin-12 und induzieren hierdurch eine  $T_H1$ -Differenzierung der T-Lymphozyten [Krug, 2001]. B-Lymphozyten können entsprechend der eigenen Daten ebenfalls über Interleukin-12 die Bildung von  $T_H1$ -Zellen unterstützen. Gleichzeitig bilden die B-Lymphozyten nach Kontakt mit CpG-ODN allerdings auch Interleukin-10. Die Arbeit von Duramad et al. hat klar belegt, dass die Produktion von Interleukin-12 in den PDCs durch die Anwesenheit von Interleukin-10 inhibiert wird [Duramad, 2003]. Ob durch

diese Hemmung der Interleukin-12-Synthese in den PDCs der  $T_H1$ -Effekt der B-Lymphozyten relativiert wird, kann mit den vorliegenden Daten nicht beantwortet werden.



**Abbildung 19: Einfluss der B-Lymphozyten auf die durch CpG-ODN induzierte  $T_H1$ -Immunantwort.** CpG-ODN ruft in den PDCs die Produktion von Interferon- $\alpha$  und in Kombination mit CD40L die Synthese von Interleukin-12 hervor. Hierdurch wird die Bildung von Interferon- $\gamma$ -produzierenden T-Lymphozyten induziert und eine  $Th1$ -gerichtete Immunantwort ausgelöst. Gleichzeitig stimuliert CpG-ODN in B-Lymphozyten in Anwesenheit von CD40L sowohl die Bildung von Interleukin-12 als auch die Bildung von Interleukin-10. Über Interleukin-12 können die B-Lymphozyten die Entstehung von Interferon- $\gamma$ -produzierenden T-Lymphozyten verstärken. Über Interleukin-10 können die B-Lymphozyten allerdings auch die Synthese von Interleukin-12 in den PDCs hemmen.

#### 4.2.7. Die Regulation der Antikörperproduktion durch CpG-Oligonukleotide

Ergänzend zum Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CpG-ODN auf die Antikörperproduktion untersucht. Es zeigte sich, dass CpG-ODN die Entwicklung von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten zu Plasmazellen verstärkte und damit die Bildung von Immunglobulinen erheblich steigerte.

#### 4.2.7.1 Verstärkung der Antikörperbildung durch CpG-ODN

In den letzten Jahren fand die Wirkung von CpG-ODN auf die Plasmazelldifferenzierung und Immunglobulinproduktion besondere Beachtung. CpG-ODN verstärkt in Gegenwart von CD40L sowohl in naiven B-Lymphozyten als auch in B-Gedächtniszellen und B-Lymphozyten aus dem Keimzentrum die Entwicklung in Richtung Plasmazelle [Jung, 2002]. Hierbei war die Anwesenheit von CD40L eine entscheidende Voraussetzung, um über CpG-ODN in B-Lymphozyten eine Synthese von Immunglobulinen zu induzieren [Gantner, 2003]. Die eigenen Daten bestätigen diese Beobachtungen, da signifikante Mengen an Plasmazellen und Immunglobulinen nur detektiert werden konnten, wenn die B-Lymphozyten mit der Kombination von CD40L und CpG-ODN stimuliert wurden.

Wurde B-Lymphozyten gleichzeitig mit einem Antigen und CpG-ODN stimuliert, konnte jedoch auch ohne zusätzliche Aktivierung mit CD40L eine starke Immunglobulinproduktion beobachtet werden [He, 2004]. Damit entzogen sich die B-Lymphozyten in Anwesenheit von CpG-ODN der Kontrolle durch die T-Lymphozyten. Anstelle der T-Lymphozyten lieferten die PDCs in Anwesenheit von CpG-ODN wichtige Faktoren für die Plasmazelldifferenzierung [Poeck, 2004]. Vor allem über die Synthese von Interferon- $\alpha$  und Interleukin-6 machten die PDCs die B-Lymphozyten unabhängig von der Hilfe durch die T-Lymphozyten [Jego, 2003]. Dies ermöglicht auf der einen Seite die frühe Etablierung einer humoralen Immunantwort. Auf der anderen Seite ist dieser Mechanismus möglicherweise verantwortlich für die Bildung von Autoantikörpern im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie dem Lupus erythematodes [Leadbetter, 2002].

CpG-ODN hat zudem einen wesentlichen Einfluss auf die Entscheidung, welcher Isotyp von Immunglobulinen gebildet wird. In der Maus wurde bei Stimulation mit CpG-ODN besonders die Synthese des Immunglobulinisotyps IgG<sub>2a</sub> beobachtet [Brazolot Millan, 1998]. Dieser Isotyp findet sich meist im Rahmen von T<sub>H</sub>1-Immunantworten. Die Bildung des Isotypen IgE wird dagegen durch die Gabe von CpG-ODN inhibiert [Liu, 2003]. Liu et al. konnten nachweisen, dass es sich hierbei um eine direkte Hemmung des Isotypenwechsels in Richtung IgE handelt. Diese Hemmung wurde über eine Hochregulation des Transkriptionsfaktors T-bet vermittelt. Somit führt CpG-ODN nicht nur auf der Seite der T-Lymphozyten zu einer T<sub>H</sub>1-Polarisierung, sondern richtet auch die humorale Immunantwort gezielt auf die Abwehr intrazellulärer Pathogene aus. Diese Hemmung einer überschießenden T<sub>H</sub>2-Immunantwort auf der Ebene der B-Lymphozyten und die gleichzeitige



Verstärkung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort könnte in Zukunft vor allem im Rahmen der Therapie allergischer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen.

#### *4.2.7.2. Wirkung von Zytokinen auf die Produktion von Autoantikörpern*

Ein wesendlicher Befund der vorliegenden Arbeit ist, dass B-Lymphozyten Zytokine in großer Menge bilden können. Wie oben erläutert, greifen sie hierdurch regulierend in das Immungeschehen ein. In diesem Abschnitt wird dargestellt, wie die überschießende Zytokinproduktion in B-Lymphozyten auch die Entstehung von autoreaktiven B-Lymphozyten zu Folge haben kann.

Nach Aktivierung mit CD40L und CpG-ODN bildeten die B-Lymphozyten große Mengen an Interleukin-6. Die unbeschränkte Sekretion von Interleukin-6 durch die B-Lymphozyten wurde in einigen Studien für die Bildung von Autoantikörpern verantwortlich gemacht. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass die B-Lymphozyten, die aus dem Blut von Patienten mit systemischen Lupus erythematoses (SLE) isoliert wurden, spontan Interleukin-6 produzieren [Kitani, 1992; Lahat, 1991; Nagafuchi, 1993; Tanaka, 1988]. Interessanterweise bildeten diese B-Lymphozyten signifikant weniger Autoantikörper, wenn sie mit blockierenden Antikörpern gegen Interleukin-6 kultiviert wurden [Kitani, 1992; Nagafuchi, 1993].

Interleukin-6 war nicht das einzige Zytokine, dass B-Lymphozyten von Patienten mit SLE gebildet wird. Vielmehr wurde von den B-Lymphozyten auch Interleukin-1, Interleukin-4 und Interleukin-10 produziert [Lahat, 1991; Tanaka, 1988]. Obwohl Interleukin-10 auch von normalen B-Lymphozyten nach Aktivierung mit verschiedenen Stimuli ausgeschüttet wurde, bildeten die B-Lymphozyten von Patienten, die an SLE, rheumatoider Arthritis oder dem Sjögens Syndrom litten, Interleukin-10 in wesentlich größeren Mengen [Llorente, 1994]. Zudem wurde von diesen B-Lymphozyten Interleukin-10 spontan ohne zusätzlichen Stimulus ausgeschüttet.

Da es sich bei Interleukin-10 um einen bekannten Differenzierungs- und Wachstumsfaktor für B-Lymphozyten handelt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Interleukin-10 den autoreaktiven B-Lymphozyten im Rahmen eines SLE als autokriner Stimulus dient [Llorente, 1994; Mongan, 1997]. So konnten Ishida et al. zeigen, dass die kontinuierliche Gabe von Antikörpern gegen Interleukin-10 im Mausmodell die Entwicklung eines SLE verzögert und die Schwere der Erkrankung abschwächt [Ishida, 1994]. Die verzögerte Entwicklung des SLE war hierbei mit einem verminderten Serumspiegel an Autoantikörpern gegen doppelsträngige DNA verbunden. Es liegt daher der Schluss nahe, dass die Bildung von Autoantikörpern und damit die

Entwicklung einer Autoimmunerkrankung von der autokinen Produktion von Zytokinen wie Interleukin-6 und Interleukin-10 durch die B-Lymphozyten abhängt.

Aufgrund der Stimulation der Antikörperproduktion und Zytokinsynthese in B-Lymphozyten besteht theoretisch die Gefahr, dass durch die Verabreichung von CpG-ODN ein Autoimmunerkrankung ausgelöst werden kann [Krieg, 2002]. Ob dies tatsächlich der Fall sein kann, ist noch sehr umstritten. In den klinischen Studien, die derzeit mit CpG-ODN durchgeführt werden, gab es zu keinem Zeitpunkt Hinweise auf die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung.

### **4.3. Der therapeutische Einsatz von CpG-Oligonukleotiden**

Bis zum heutigen Zeitpunkt erhielten über 400 Patienten im Rahmen von klinischen Studien CpG-ODN. Das Ziel ist es, die viel versprechenden Ergebnisse aus Tierversuchen auf den Menschen zu übertragen. Inwieweit CpG-ODN die hohen Erwartungen erfüllen wird, ist noch nicht abzusehen, da bisher nur wenige Daten aus diesen Studien veröffentlicht wurden.

#### **4.3.1. CpG-Oligonukleotide als Vakzine-Adjuvans**

Die Impfung stellt die effektivste Methode zur Prevention von Infektionen dar. Allerdings ist es in vielen Fällen bisher noch nicht gelungen einen Impfstoff gegen bestimmte Erreger wie z. B. das Hepatitis C-Virus zu entwickeln. Zudem setzt eine erfolgreiche Impfung ein reaktionsfähiges Immunsystem voraus. Da dies bei immunsupprimierten Patienten nicht gegeben ist, führen hier Impfungen in einigen Fällen nicht zum gewünschten Erfolg. Ein starker Immunstimulator wie CpG-ODN könnte in diesen Fällen für die notwendige Aktivierung des Immunsystems sorgen.

Dass sich CpG-ODN hervorragend als Vakzine-Adjuvans eignet, haben Studien an Schimpansen nachgewiesen [Hartmann, 2000]. Wurde den Tieren eine Kombination aus CpG-ODN und der Hepatitis B-Vakzine Engerix B verabreicht, kam es im Vergleich zur alleinigen Gabe von Engerix B wesentlich schneller zu protektiven Antikörpertitern.

CpG-ODN ermöglichte darüber hinaus die Vakzinierung gegen Antigene, gegenüber denen das Immunsystem ohne zusätzliche Stimulation keine Immunantwort etabliert. Dies belegt eine Impfstudie an Orang Utans. Im Gegensatz zu den Schimpansen lassen sich Orang Utans mit der herkömmlichen Vakzine gegen Hepatitis B nicht

immunisieren. Durch Zugabe von CpG-ODN kam es aber bei den mehr als hundert geimpften Orang Utans zu einem schnellen und kompletten Impfschutz [Davis, 2000].

#### 4.3.2. CpG-Oligonukleotide in der Immuntherapie von Tumoren

CpG-ODN ist ein viel versprechender Kandidat für die Immuntherapie maligner Erkrankungen, da CpG-ODN sowohl die angeborenen als auch die erworbene Immunantwort für die Tumorbekämpfung aktiviert. In Tiermodellen wurde die antitumorale Wirkung von CpG-ODN vielfach belegt [Carpentier, 1999; Dow, 1999; Heckelsmiller, 2002; Sfondrini, 2002; Wooldridge, 1997]. Im Rahmen von klinischen Studien wird CpG-ODN zur Zeit Patienten mit malignem Melanom, nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, Nierenzellkarzinom, kutanem T-Zell-Lymphom und verschiedenen Arten des Non-Hodkin-Lymphoms in Kombination mit konventionellen Therapieverfahren verabreicht.

2003 begann die Coley Pharmaceutical Group eine randomisierte Phase-II-Studie an Patienten mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom. Hierbei wird die Kombination von CpG-ODN und Chemotherapie mit der alleinigen Chemotherapie verglichen. Die aktuelle Auswertung der Studie, in die bis jetzt 112 Patienten eingeschlossen wurden, zeigt ein verbessertes Ansprechen auf die konventionelle Therapie (37% vs. 19%) und ein verbessertes Überleben (12,8 Monate vs. 6,8 Monate), wenn CpG-ODN zusätzlich zur Chemotherapie verabreicht wurde.

In den Phase-II-Studien zur Behandlung des Melanoms und des kutanen T-Zell-Lymphoms konnte in einigen Fällen ein Ansprechen des Tumors auf CpG-ODN nachgewiesen werden. Eine genauere Analyse der Studienergebnisse muss aber noch abgewartet werden. Die bisherigen Phase-I-Studien zur Behandlung der anderen Tumorentitäten deuten auf eine relativ gute Verträglichkeit von CpG-ODN hin.

#### 4.3.3. CpG-Oligonukleotide in der Immuntherapie allergischer Erkrankungen

Bisher wurde CpG-ODN in klinischen Studien zur Behandlung von Allergien und Asthma verwendet. CpG-ODN wird im Rahmen allergischer Erkrankungen aufgrund der Ergebnisse aus Tierversuchen eingesetzt, die belegen, dass durch die Gabe von CpG-ODN eine starke  $T_H2$ -Polarisierung des Immunsystems in eine  $T_H1$ -gerichtete Immunantwort gegen die entsprechenden Allergene umgewandelt wird [Kline, 1998; Parronchi, 1999].

---

Leiden Menschen unter einer starken Allergie, die bei Insektengiften lebensbedrohliche Ausmaße annehmen kann, wird in vielen Fällen eine Desensibilisierung durch wiederholte Gabe des Allergens durchgeführt. CpG-ODN könnte als Adjuvants den Prozess der Desensibilisierung deutlich beschleunigen, da gezielt die  $T_H2$ -gerichtete Immunantwort antagonisiert wird. Es ist aber besonders im Rahmen der Therapie von Allergien wichtig, dass die Patienten durch den Einsatz von CpG-ODN nicht unnötigen Risiken und Nebenwirkungen ausgesetzt werden. Die laufenden klinischen Phase-I-Studien haben allerdings gezeigt, dass CpG-ODN relativ gut vertragen wird. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass CpG-ODN sehr selektiv in das Immunsystem eingreift.

Da CpG-Oligonukleotide zunehmend in klinischen Studien zum Einsatz kommen, ist es wichtig ihren genauen Wirkmechanismus weiter zu erforschen, um neben den möglichen therapeutischen Effekten auch die Risiken einer Behandlung mit CpG-Oligonukleotide besser einschätzen zu können.

## 5. Zusammenfassung

### *Hintergrund*

CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) sind synthetische Analoga mikrobieller DNA. CpG-Oligonukleotide werden wie mikrobielle DNA vom Immunsystem über den *Toll-like-Rezeptor 9* (TLR9) erkannt. Mikrobielle DNA dient als Gefahrensignal im Rahmen einer Infektion. Das Immunsystem detektiert mit Hilfe von TLR9 so genannte CpG-Motive innerhalb der mikrobiellen DNA und der CpG-Oligonukleotide. CpG-Motive sind nichtmethylierte Cytidin-(phosphat)-Guanosin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen.

CpG-Oligonukleotide rufen eine Immunantwort hervor, die besonders für die Abwehr von intrazellulären Erregern geeignet ist. Sie wird als  $T_H1$ -Immunantwort bezeichnet und ist durch die Entwicklung Interferon- $\gamma$ -produzierender T-Lymphozyten charakterisiert. Nach Gabe von CpG-Oligonukleotiden nimmt die Immunantwort ihren Ausgang von plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs) und B-Lymphozyten. Nur diese beiden Zelltypen exprimieren im humanen Immunsystem TLR9. PDCs induzieren die Entwicklung einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort durch die Synthese von Interferon- $\alpha$ , welches die Differenzierung von naiven T-Lymphozyten in Interferon- $\gamma$ -produzierende T-Lymphozyten unterstützt. Die Funktion der B-Lymphozyten wird bisher vor allem in der Etablierung der humoralen Immunantwort durch die Produktion von Antikörpern gesehen.

### *Fragestellung*

Den Anstoß für diese Arbeit lieferte die Hypothese, dass B-Lymphozyten neben der Produktion von Antikörpern auch über die Sekretion von Zytokinen und die Präsentation von kostimulatorischen Molekülen in eine durch CpG-Oligonukleotide ausgelöste Immunantwort eingreifen. Zunächst war zu klären, welche Art von Zytokinen die B-Lymphozyten nach Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden und CD40 Ligand (CD40L) bilden und welche Subpopulationen der B-Lymphozyten zur Zytokinsynthese beitragen.

Anschließend wurde untersucht, ob die B-Lymphozyten nach Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden den T-Lymphozyten als effektive kostimulatorische Zellen dienen und über ihre Zytokinsynthese eine T<sub>H</sub>1-Differenzierung der T-Lymphozyten initiieren können.

### *Ergebnisse*

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das CpG-Oligonukleotid ODN 2006 (CpG-ODN) einen starken Stimulus für naive B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen darstellt. Es wurde nachgewiesen, dass beide Subpopulationen TLR9 exprimieren. CpG-ODN induzierte in B-Lymphozyten die Produktion von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- $\alpha$ . Wurden die B-Lymphozyten gleichzeitig mit CpG-ODN und CD40L inkubiert, konnte die Synthese der Zytokine wesentlich gesteigert werden. Bei gleichzeitiger Aktivierung mit CpG-ODN und CD40L waren B-Lymphozyten zudem fähig, das biologisch aktive (p70) Heterodimer des Interleukin-12 (Interleukin-12p70) zu produzieren.

CpG-ODN steigerte neben der Zytokinproduktion auch die Bildung von IgM in CD40L-aktivierten B-Lymphozyten. Wurden B-Lymphozyten mit CD40L oder der Kombination von CD40L und CpG-ODN aktiviert, entwickelten sie sich über die vermehrte Expression von CD80 und CD86 zu potenten kostimulatorischen Zellen und induzierten die Proliferation naiver allogener T-Lymphozyten. Durch die Synthese von Interleukin-12p70 waren die B-Lymphozyten zudem in der Lage, in T-Lymphozyten eine verstärkte Produktion von Interferon- $\gamma$  auszulösen. Somit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass humane B-Lymphozyten *in vitro* fähig sind, nach Kontakt mit CpG-ODN eine T<sub>H</sub>1-Differenzierung von T-Lymphozyten zu induzieren.

### *Beurteilung und Schlussfolgerung*

Die Funktion der B-Lymphozyten im Rahmen einer durch CpG-Oligonukleotide ausgelösten Immunreaktion beschränkt sich nicht nur auf die Bereitstellung von Antikörpern, sondern B-Lymphozyten regulieren über ihre Zytokinproduktion auch die von T-Lymphozyten getragene zelluläre Immunantwort. Das Wissen

---

um die immunmodulierende Funktion der B-Lymphozyten könnte von hoher Relevanz bei der Entwicklung therapeutischer Anwendungen von CpG-Oligonukleotiden sein. Dies gilt insbesondere für die Verwendung von CpG-Oligonukleotiden zur Behandlung von Erkrankungen wie Allergien und Autoimmunerkrankungen, bei denen B-Lymphozyten eine wichtige pathogenetische Rolle spielen.

---

## 6. Literaturverzeichnis

- Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002; 32:1958-1968
- Airolidi I, Guglielmino R, Carra G, Corcione A, Gerosa F, Tadorelli G, Trinchieri G, Pistoia V. The interleukin-12 and interleukin-12 receptor system in normal and transformed human B lymphocytes. *Haematologica* 2002; 87:434-442
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413:732-738
- Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, Bajorath J, Grosmaire LS, Stenkamp R, Neubauer M, . The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 1993; 72:291-300
- Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL, Somoza C. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 1993; 366:76-79
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811
- Banchereau J, Briere F, Liu YJ, Rousset F. Molecular control of B lymphocyte growth and differentiation. *Stem Cells* 1994; 12:278-288
- Bastien Y, Toledano BJ, Mehio N, Cameron L, Lamoukhaid B, Renzi P, Hamid Q, Mazer BD. Detection of functional platelet-activating factor receptors on human tonsillar B lymphocytes. *J Immunol* 1999; 162:5498-5505
- Bauer M, Heeg K, Wagner H, Lipford GB. DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner. *Immunology* 1999; 97:699-705
- Bauer M, Redecke V, Ellwart JW, Scherer B, Kremer JP, Wagner H, Lipford GB. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:5000-5007
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9237-9242
- Bekeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, Giese T, Schnurr M, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J Immunol* 2005; 174:4043-4050
- Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 2003; 101:4500-4504



- Bishop GA, Hsing Y, Hostager BS, Jalukar SV, Ramirez LM, Tomai MA. Molecular mechanisms of B lymphocyte activation by the immune response modifier R-848. *J Immunol* 2000; 165:5552-5557
- Bohle B, Orel L, Kraft D, Ebner C. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce low levels of TNF-alpha in human B lymphocytes: possible adjuvants for Th1 responses. *J Immunol* 2001; 166:3743-3748
- Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* 2003; 102:956-963
- Brazolot Millan CL, Weeratna R, Krieg AM, Siegrist CA, Davis HL. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:15553-15558
- Carpentier AF, Chen L, Maltonti F, Delattre JY. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res* 1999; 59:5429-5432
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5:919-923
- Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res* 1991; 3-11
- Davila E, Celis E. Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity. *J Immunol* 2000; 165:539-547
- Davis HL, Suparto II, Weeratna RR, Jumintarto, Iskandriati DD, Chamzah SS, Ma'ruf AA, Nente CC, Pawitri DD, Krieg AM, Heriyanto, Smits W, Sajuthi DD. CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* 2000; 18:1920-1924
- Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 1998; 160:870-876
- Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2000; 95:999-1006
- Dow SW, Fradkin LG, Liggitt DH, Willson AP, Heath TD, Potter TA. Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and antitumor activity when administered intravenously. *J Immunol* 1999; 163:1552-1561

- Dubois B, Massacrier C, Vanbervliet B, Fayette J, Briere F, Banchereau J, Caux C. Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J Immunol* 1998; 161:2223-2231
- Dubois B, Vanbervliet B, Fayette J, Massacrier C, van Kooten C, Briere F, Banchereau J, Caux C. Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* 1997; 185:941-951
- Durali D, de Goer de Herve MG, Giron-Michel J, Azzarone B, Delfraissy JF, Taoufik Y. In human B cells, IL-12 triggers a cascade of molecular events similar to Th1 commitment. *Blood* 2003; 102:4084-4089
- Duramad O, Fearon KL, Chan JH, Kanzler H, Marshall JD, Coffman RL, Barrat FJ. IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG-containing immunostimulatory sequences. *Blood* 2003; 102:4487-4492
- Fayette J, Durand I, Bridon JM, Arpin C, Dubois B, Caux C, Liu YJ, Banchereau J, Briere F. Dendritic cells enhance the differentiation of naive B cells into plasma cells in vitro. *Scand J Immunol* 1998; 48:563-570
- Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002; 3:944-950
- Fitzgerald-Bocarsly P. Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol Ther* 1993; 60:39-62
- Flaishon L, HersHKoviz R, Lantner F, Lider O, Alon R, Levo Y, Flavell RA, Shachar I. Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. *J Exp Med* 2000; 192:1381-1388
- Gantner F, Hermann P, Nakashima K, Matsukawa S, Sakai K, Bacon KB. CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol* 2003; 33:1576-1585
- Goodnow CC, Cyster JG, Hartley SB, Bell SE, Cooke MP, Healy JI, Akkaraju S, Rathmell JC, Pogue SL, Shokat KP. Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv Immunol* 1995; 59:279-368
- Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 1998; 17:6230-6240
- Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 2001; 166:15-19
- Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, Johnson LL, Swain SL, Lund FE. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 2000; 1:475-482

- Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, Endres S. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- $\alpha$  induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33:1633-1641
- Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000; 164:944-953
- Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, Suparto I, Rasmussen WL, Waldschmidt M, Sajuthi D, Purcell RH, Davis HL, Krieg AM. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000; 164:1617-1624
- Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:9305-9310
- Hathcock KS, Laszlo G, Dickler HB, Bradshaw J, Linsley P, Hodes RJ. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science* 1993; 262:905-907
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410:1099-1103
- He B, Qiao X, Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J Immunol* 2004; 173:4479-4491
- Heckelsmiller K, Beck S, Rall K, Sipos B, Schlamp A, Tuma E, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 2002; 32:3235-3245
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3:196-200
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740-745
- Henry J, Miller MM, Pontarotti P. Structure and evolution of the extended B7 family. *Immunol Today* 1999; 20:285-288
- Ho WY, Cooke MP, Goodnow CC, Davis MM. Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 1994; 179:1539-1549
- Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougerolles A, Endres S, Hartmann G. Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11:263-270

- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531-4537
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162:3749-3752
- Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S, Andrade S, Menon S, Howard M. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Exp Med* 1994; 179:305-310
- Jahrsdorfer B, Hartmann G, Racila E, Jackson W, Muhlenhoff L, Meinhardt G, Endres S, Link BK, Krieg AM, Weiner GJ. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* 2001; 69:81-88
- Jahrsdorfer B, Muhlenhoff L, Blackwell SE, Wagner M, Poeck H, Hartmann E, Jox R, Giese T, Emmerich B, Endres S, Weiner GJ, Hartmann G. B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1490-1499
- Jego G, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* 2001; 97:1817-1822
- Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003; 19:225-234
- Johansson-Lindbom B, Borrebaeck CA. Germinal center B cells constitute a predominant physiological source of IL-4: implication for Th2 development in vivo. *J Immunol* 2002; 168:3165-3172
- Jung J, Yi AK, Zhang X, Choe J, Li L, Choi YS. Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *J Immunol* 2002; 169:2368-2373
- Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002; 3:499-
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194:863-869
- Karlin S, Ladunga I, Blaisdell BE. Heterogeneity of genomes: measures and values. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:12837-12841

- Kitani A, Hara M, Hirose T, Harigai M, Suzuki K, Kawakami M, Kawaguchi Y, Hidaka T, Kawagoe M, Nakamura H. Autostimulatory effects of IL-6 on excessive B cell differentiation in patients with systemic lupus erythematosus: analysis of IL-6 production and IL-6R expression. *Clin Exp Immunol* 1992; 88:75-83
- Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; 188:1679-1689
- Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, Krieg AM. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998; 160:2555-2559
- Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:2879-2883
- Krieg AM. A role for Toll in autoimmunity. *Nat Immunol* 2002; 3:423-424
- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:709-760
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374:546-549
- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:2154-2163
- Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engemann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001; 31:3026-3037
- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000; 1:398-401
- Lahat N, Aghai E, Maroun B, Kinarty A, Quitt M, Froom P. Increased spontaneous secretion of IL-6 from B cells of patients with B chronic lymphatic leukaemia (B-CLL) and autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 1991; 85:302-306
- Lane P, Traunecker A, Hubele S, Inui S, Lanzavecchia A, Gray D. Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992; 22:2573-2578

- Lanzavecchia A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:773-793
- Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* 2003; 63:2836-2843
- Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; 416:603-607
- Lee BO, Haynes L, Eaton SM, Swain SL, Randall TD. The biological outcome of CD40 signaling is dependent on the duration of CD40 ligand expression: reciprocal regulation by interleukin (IL)-4 and IL-12. *J Exp Med* 2002; 196:693-704
- Liang H, Nishioka Y, Reich CF, Pisetsky DS, Lipsky PE. Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest* 1996; 98:1119-1129
- Liu N, Ohnishi N, Ni L, Akira S, Bacon KB. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nat Immunol* 2003; 4:687-693
- Liu YJ, Banchereau J. Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin Immunol* 1997; 9:235-240
- Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, Alcocer-Varela J, Wijdenes J, Fourrier BM, Galanaud P, Emilie D. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1647-1655
- Lund FE, Garvy BA, Randall TD, Harris DP. Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. *Curr Dir Autoimmun* 2005; 8:25-54
- Macfarlane DE, Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol* 1998; 160:1122-1131
- Manzel L, Macfarlane DE. Lack of immune stimulation by immobilized CpG-oligodeoxynucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1999; 9:459-464
- Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* 2003; 197:489-501
- McKenzie AN. Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13. *Pharmacol Ther* 2000; 88:143-151
- Medzhitov R. CpG DNA: security code for host defense. *Nat Immunol* 2001; 2:15-16
- Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 2002; 16:219-230

- Mongan AE, Ramdahin S, Warrington RJ. Interleukin-10 response abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1997; 46:406-412
- Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. 1976. *J Urol* 2002; 167:891-893
- Nagafuchi H, Suzuki N, Mizushima Y, Sakane T. Constitutive expression of IL-6 receptors and their role in the excessive B cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1993; 151:6525-6534
- Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164:558-561
- Ohnishi E, Iwata T, Inouye S, Kurata T, Sairenji T. Interleukin-4 production in Epstein-Barr virus-transformed B cell lines from peripheral mononuclear cells of patients with atopic dermatitis. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17:597-602
- Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:259-264
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF, III. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276:10229-10233
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13766-13771
- Parronchi P, Brugnolo F, Annunziato F, Manuelli C, Sampognaro S, Mavilia C, Romagnani S, Maggi E. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors. *J Immunol* 1999; 163:5946-5953
- Peng SL. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:230-236
- Pistoia V. Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol Today* 1997; 18:343-350
- Pleiman CM, D'Ambrosio D, Cambier JC. The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunol Today* 1994; 15:393-399
- Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 2004; 103:3058-3064

- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085-2088
- Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996; 381:751-758
- Redford TW, Yi AK, Ward CT, Krieg AM. Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1998; 161:3930-3935
- Reid GS, She K, Terrett L, Food MR, Trudeau JD, Schultz KR. CpG stimulation of precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia induces a distinct change in costimulatory molecule expression and shifts allogeneic T cells toward a Th1 response. *Blood* 2005; 105:3641-3647
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:588-593
- Rothenfusser S, Hornung V, Ayyoub M, Britsch S, Towarowski A, Krug A, Sarris A, Lubenow N, Speiser D, Endres S, Hartmann G. CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8<sup>+</sup> T-cell responses in vitro. *Blood* 2004; 103:2162-2169
- Sallusto F, Langenkamp A, Geginat J, Lanzavecchia A. Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 251:167-171
- Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M, Salvatierra O, Jr. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003; 349:125-138
- Schultze JL, Michalak S, Lowne J, Wong A, Gilleece MH, Gribben JG, Nadler LM. Human non-germinal center B cell interleukin (IL)-12 production is primarily regulated by T cell signals CD40 ligand, interferon gamma, and IL-10: role of B cells in the maintenance of T cell responses. *J Exp Med* 1999; 189:1-12
- Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, Daley J, Delgado JC, Gribben JG, Nadler LM. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* 1997; 100:2757-2765
- Sfondrini L, Besusso D, Rumio C, Rodolfo M, Menard S, Balsari A. Prevention of spontaneous mammary adenocarcinoma in HER-2/neu transgenic mice by foreign DNA. *FASEB J* 2002; 16:1749-1754
- Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, Tamura G. B cells capturing antigen conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12. *J Immunol* 2002; 169:787-794



- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284:1835-1837
- Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Erdmann A, Hacker H, Heeg K, Wagner H. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *Eur J Immunol* 1997; 27:1671-1679
- Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 1996; 157:2116-2122
- Stavnezer J. Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol* 1996; 8:199-205
- Sun CM, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R. Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity* 2005; 22:467-477
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11:443-451
- Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF, Akira S. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2000; 164:554-557
- Tanaka Y, Saito K, Shirakawa F, Ota T, Suzuki H, Eto S, Yamashita U. Production of B cell-stimulating factors by B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1988; 141:3043-3049
- Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002; 195:99-111
- Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, . Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72:955-962
- Tomai MA, Imbertson LM, Stanczak TL, Tygrett LT, Waldschmidt TJ. The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes. *Cell Immunol* 2000; 203:55-65
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; 401:811-815
- Vabulas RM, Pircher H, Lipford GB, Hacker H, Wagner H. CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 2000; 164:2372-2378

- 
- Verthelyi D, Kenney RT, Seder RA, Gam AA, Friedag B, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *J Immunol* 2002; 168:1659-1663
- Wooldridge JE, Ballas Z, Krieg AM, Weiner GJ. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* 1997; 89:2994-2998
- Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* 1992; 36:983-997
- Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Komuro K, Kohase M, Tokunaga T. Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85:775-779
- Yao Y, Li W, Kaplan MH, Chang CH. Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *J Exp Med* 2005; 201:1899-1903
- Yi AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol* 1998; 160:5898-5906
- Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa YI, Iwakura Y, Nakanishi K. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:3948-3953

## 7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

APC	Allophycocyanin
AMV	<i>Avian myoblastosis virus</i>
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
Be	<i>Effector B cells</i>
cDNA	<i>copy-Desoxyribonukleinsäure</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40 Ligand
CFSE	5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CpG	Cytidin-(phosphat)-Guanosin-Dinukleotid
cpm	<i>Counts per minute</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
HSA	Humanes Serum-Albumin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
IPC	Interferon-produzierende Zelle
IRAK	IL-1R-assoziierte Kinase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
MLR	<i>Mixed lymphocyte reaction</i>

---

mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
O.D.	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotide
PAF	<i>Platelet-activating factor</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen der peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
T <sub>H</sub>	T-Helfer
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF 6	TNFR-assoziiertes Faktor 6

---

## 8. Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres bedanke ich mich für die Aufnahme in seine Abteilung, die angenehme Atmosphäre bei der Arbeit und für die Möglichkeit zum Besuch internationaler Kongresse.

Bei Herrn Prof. Dr. Gunther Hartmann möchte ich mich ausdrücklich für die große Unterstützung und die herausragende Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten bedanken.

Herrn Dr. Bernd Jahrsdörfer danke ich für die Einführung in die Arbeitstechniken der Immunologie. Ganz herzlich möchte ich Frau Rosemarie Kiefl für die tägliche Hilfe bei der Laborarbeit danken.

Ferner gilt mein Dank den Mitdoktoranden Hendrik Poeck, Julia Battiany, Domenik Prell, Anja Sarris und Miren Kerkmann.

## 9. Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

1. Wollenberg A, **Wagner M**, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, Rothenfusser S, Wetzel S, Endres S, Hartmann G.  
Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases.  
*Journal of Investigative Dermatology* 2002; 119(5):1096-102
2. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, **Wagner M**, Sarris A, Giese T, Endres S, Hartmann G.  
Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells.  
*Journal of Immunology* 2003; 170(9):4465-74
3. Hartmann G, Battiany J, Poeck H, **Wagner M**, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, Endres S.  
Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells.  
*European Journal of Immunology* 2003; 33(6):1633-41
4. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, **Wagner M**, Wellisch D, Mack B, Giese T, Gires O, Endres S, Hartmann G.  
Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer.  
*Cancer Research* 2003; 63(19):6478-87
5. **Wagner M**, Poeck H, Jahrsdoerfer B, Rothenfusser S, Prell D, Bohle B, Tuma E, Giese T, Ellwart JW, Endres S, Hartmann G.  
IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA.  
*Journal of Immunology* 2004; 172(2):954-63
6. Poeck H, **Wagner M**, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G.  
Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help.  
*Blood* 2004; 103(8):3058-64
7. Schnurr M, Toy T, Shin A, **Wagner M**, Cebon J, Maraskovsky E.  
Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway.  
*Blood* 2005; 105(4):1582-9

8. Jahrsdorfer B, Muhlenhoff L, Blackwell SE, **Wagner M**, Poeck H, Hartmann E, Jox R, Giese T, Emmerich B, Endres S, Weiner GJ, Hartmann G.  
B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides.  
*Clinical Cancer Research* 2005; 11(4):1490-9
9. Berkeredjian-Ding IB, **Wagner M**, Hornung V, Giese T, Schnurr M, Endres S, Hartmann G.  
Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN.  
*Journal of Immunology* 2005; 174(7):4043-50

## Übersichtsarbeiten

1. Rothenfusser S, Tuma E, **Wagner M**, Endres S, Hartmann G.  
Recent advances in immunostimulatory CpG oligonucleotides.  
*Current Opinion in Molecular Therapeutics* 2003; 5(2):98-106

## Abstracts

1. **Wagner M**, Jahrsdörfer B, Endres S, Hartmann G.  
CpG-ODN and CD40 ligand are required to induce bioactive IL-12p70 in human primary B cells.  
*Activating Immunity with CpG-Oligonucleotides 2001*  
Amelia Island, USA
2. **Wagner M**, Poeck H, Jahrsdörfer B, Rothenfusser S, Sarris A, Kerkmann M, Giese T, Ellwart J, Endres E, Hartmann G.  
IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40L and CpG DNA.  
*Annual Meeting of the American Association of Immunologists 2003*  
Denver, USA

---

## 10. Lebenslauf

Philipp Moritz Wagner

Geboren am 27.09.1977 in München

als Sohn von Marianna Wagner und Dr. Udo Wagner

### Schul Ausbildung

1988 - 1997            Maximiliansgymnasium, München  
1997                    Allgemeine Hochschulreife (Note 1,7)

### Zivildienst

1997 - 1998            Zivildienst, Stiftung Pfennigparade

### Hochschulausbildung

1998                    Beginn des Studiums der Humanmedizin  
                          an der Ludwig-Maximilians-Universität München

1999 - 2000            Studium an der Universidad Miguel Hernandez,  
                          Alicante, Spanien

2000                    Physikum (Note 2,3)

2002                    I. Staatsexamen (Note 2,0)

2004                    II. Staatsexamen (Note 1,7)

2004 - 2005            Praktisches Jahr

*Teil I:* Allgemein- und Unfallchirurgie  
                          Städtisches Krankenhaus München-Harlaching  
                          Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität  
                          München

*Teil II:* Innere Medizin  
                          Städtisches Krankenhaus München-Harlaching  
                          Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität  
                          München

*Teil III:* Radiologie  
                          Institut für Klinische Radiologie - Großhadern  
                          Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

2005                    III. Staatsexamen (Note 2,0)

                          Abschluss des Studiums der Humanmedizin und Erlangung der  
                          ärztlichen Teilapprobation (Gesamtnote 1,8)



---

## Promotion

2001 - 2003

Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik Innenstadt,

Klinikum der Universität München

„CpG-Oligonukleotide: Einfluss auf die Zytokinproduktion und die kostimulatorische Fähigkeit humaner B-Lymphozyten“

## Beruf

Ab Januar 2006

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Radiologie

Leiter: Prof. Dr. med. Bernd Hamm

Campus Charité Mitte

Humboldt Universität zu Berlin